

Vol XVII, No. 2

March, 1933

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hosen; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Ichome Kagacho, Ushigome.

Price: \$ 5.50 per volume.



## KONSTITUTION DER POLYPEPTIDE UND PROTEOLYTISCHE FERMENTE.

VON

JUJIRO MATSUI.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie  
zu Chiba. Director: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 1. December 1932)

Vor zwei Jahren hat Suzuki (1931) aus dem hiesigen Institut über die Hydrolyse der asparaginsäurehaltigen Polypeptide berichtet. Unter den von ihm dargestellten Polypeptiden war das Asparaglydityrosin vor allem wertvoll, weil dieses Tripeptid ausschliesslich durch aktiviertes Trypsin hydrolysiert wurde. Die Wirkung des Erepsins oder nichtaktivierten Trypsins wurde aber verneint.

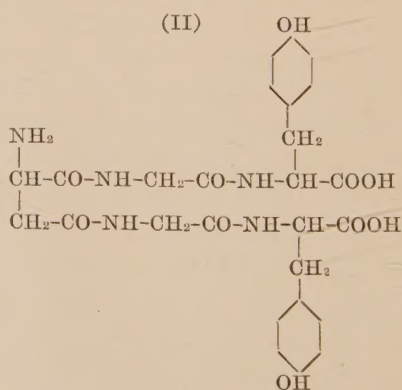
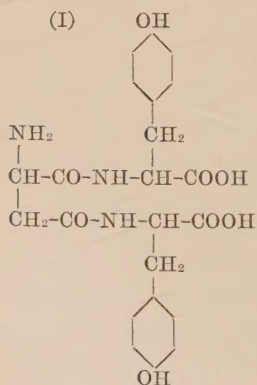
Nach dem Vorschlag von Grassmann (1928) gebraucht man nun allgemein die Benennung Proteinase für diejenigen Fermente, die das genuine Eiweiss direkt hydrolytisch angreifen können. Wir wissen dank den Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz und anderen, dass die Wirkung der Proteinasen, d. h. des Pepsins, des aktivierten Kathepsins und Trypsins, nichts anderes als die Aufspaltung der CONH-Bindung ist, und dass der zeitliche Zuwachs an freigemachten Amino- und Carboxylgruppen immer im Verhältnis 1:1 vor sich geht. Die Frage, was für Aminosäuren überhaupt an dem Aufbau der betreffenden CO-NH-Bindung teilnehmen, wurde jedoch nicht gelöst, obwohl sie für die Chemie des Eiweisses besonders wichtig ist. Durch die reine Isolierung der proteolytischen Spaltprodukte voneinander, könnte ein wesentlicher Fortschritt der Eiweisschemie erstens erzielt werden, wenn eine vorstehende oder endständige Aminosäure der entstandenen Polypeptidketten chemisch nachweisbar wäre. Aber da die durch die Proteinasen erzielten Spaltprodukte sehr mannigfaltig sind, kann die Bestimmung der an einzelnen losgelösten CO-NH-Bindungen teilnehmenden Aminosäuren nicht sehr leicht ausgeführt werden. Besonders bei dem aktivierten Trypsin ist es sozusagen fast

aussichtslos, weil das Ferment eben die Wirkung des nicht aktivierten Trypsins beibehält, das auf die primären Abbauprodukte durch das aktivierte Ferment selbst noch wirksam ist. Zweitens könnten die durch die Proteinase aufspaltbaren CO-NH-Bindungen bei der systematischen Untersuchung mit künstlich aufgebauten Polypeptiden entdeckt werden, obwohl das eine recht mühsame Arbeit sein dürfte. In der Literatur sind schon viele Angaben zu finden, aber es wurde noch kein Polypeptid dargestellt, das definitiv spezifisch durch irgendeine Proteinase aufspaltbar war. Die Synthese des oben erwähnten Asparagyldityrosins, eines spezifischen Substrats für aktiviertes Trypsin, ist darum sehr bemerkenswert, obwohl noch andere solche Polypeptide in der Zukunft aufzusuchen bleiben.

Die gestellte Frage bezüglich der vorliegenden Experimente war wie folgt: Kann man aus dem Ergebnis, dass Asparagyldityrosin ausschliesslich durch das aktivierte Trypsin hydrolysiert wird, ohne weiteres annehmen, dass im Eiweissmolekül die Bindung zwischen der Asparaginsäure und dem Tyrosin besteht, und dass diese Bindung gerade ein spezifischer Angriffspunkt des aktivierten Trypsins ist?

Der Verfasser hat unter Leitung von Prof. Akamatsu das Asparagyldiglycyltyrosin dargestellt und sein Verhalten gegen Proteasen geprüft. Dieses Pentapeptid kristallisiert in Nadeln und schmilzt bei 183°C.

Die neue Substanz (II) hat die folgende Formel.



Im Vergleich mit dem Asparagyldityrosin (I) von Suzuki binden in dem neuen Polypeptid die beiden Carboxylgruppen der Asparaginsäure nicht direkt mit dem Tyrosin, sondern indirekt durch die Vermittelung des Glycins. Bei beiden Polypeptiden gehört die freie Aminogruppe zu der Asparaginsäure und die freien Carboxylgruppen zu dem Tyrosin.

Der Fermentversuch ergab, dass das Asparagyldiglycyltyrosin, genau so wie das Asparagyldityrosin, durch Pepsin, Erepsin oder nicht aktiviertes Trypsin nicht hydrolysiert, aber spezifisch durch das mit der Enterokinase aktivierte Trypsin aufgespalten wurde. Bei  $\text{pH}$  8.02 war die Hydrolyse nach 4 Stunden 26.4% und nach 24 Stunden 49.1%. Wegen Mangel an Substrat konnte das  $\text{pH}$ -Optimum nicht festgestellt werden.

Wir haben damit ein zweites synthetisches Substrat, das spezifisch durch das aktivierte Trypsin hydrolysierbar ist. Das Einkeilen des Glycinrests mitten in die  $\text{CO-NH}$ -Bindung zwischen der Asparaginsäure und dem Tyrosin verändert nicht das Verhalten des entstandenen Pentapeptids gegen die proteolytischen Fermente. Man kann also nicht erwarten, dass ein Angriffspunkt des aktivierten Trypsins im genuinen Eiweissmolekül durch die Bindung zwischen der Monoaminodicarbonsäure, z. B. der Asparaginsäure und dem Tyrosin vertreten wird. Aber wenigstens sollte gesagt werden, dass das direkte oder indirekte Binden der beiden Carboxylgruppen der Asparaginsäure mit den Tyrosinaminogruppen eine Grundbedingung für die spezifische Hydrolysierbarkeit durch das aktivierte Trypsin ist. Aus dem vorliegenden Experiment kann man ausserdem noch den folgenden Schluss ziehen: das Glycyltyrosin ist bekanntlich ein spezifisches Substrat für das Erepsin. Diese ereptische Aufspaltbarkeit wird aber, sobald als die Asparaginsäure mit ihren beiden Carboxylgruppen die freie Aminogruppe von 2 Molekülen des betreffenden Dipeptids deckt, verloren, und dabei entsteht gleichzeitig eine neue wichtige Eigenschaft, die spezifische Angreifbarkeit durch das aktivierte Trypsin, einen Vertreter der Proteinasen.

## EXPERIMENTELLER TEIL.

*I. Darstellung des Asparagyldiglycyltyrosins.*

Glycyltyrosinäthylesterechlorhydrat wurde nach Angabe von Fischer (1904) dargestellt. Das Chlorhydrat bildete wetzsteinartige Kristalle und schmolz bei  $240^{\circ}\text{C}$ . 8.8 g Substanz wurden in 100 ccm Chloroform suspendiert, unter starker Kühlung mit 14.1 ccm 2n-Natronlauge versetzt und tüchtig geschüttelt. Der Glycyltyrosinäthylester ging dabei in Lösung. 1.1 g frisch destillierten Fumarylchlorids ( $1/4$  Mol) in 15 ccm Chloroform wurde in die Lösung auf einmal eingegossen, die dann stark geschüttelt und 30 Minuten stehen gelassen wurde. Um das mitgefällte Glycyltyrosinesterechlorhydrat für die weitere Fumarylierung nützlich zu machen, fügte man darzu 8 ccm 10%igen Natriumcarbonat hinzu. Es folgte dann der Zusatz von abwechselnd 1.1 g Fumarylchlorids ( $1/4$  Mol) und 15 ccm 10%iger Natriumcarbonatlösung in Portionen. Während des Verfahrens wurde die Reaktionsmasse mit Eiswasser abgekühlt. Die Fumarylierung dauerte im ganzen 2 Stunden. Da der Fumaryldiglycyltyrosinäthylester sowohl in Chloroform als in Wasser unlöslich war, wurde die ganze Reaktionsmasse durch Nutsche abgesaugt und der gesammelte Rückstand mit Chloroform, Wasser und Äther gewaschen. Ausbeute 3.3 g. Man suspendierte 3.3 g Ester in 10 ccm Wasser und versetzte bei Zimmertemperatur mit 21.5 ccm (4 Mol) n-Natronlauge. Der Ester ging bald in Lösung. Nach  $1/4$  Stunde wurde mit einer gleichen Menge n-HCl versetzt, und die abgeschiedene Masse wurde aus heissem Wasser umkristallisiert. Ausbeute 2.8 g. Das Fumaryldiglycyltyrosin bildete nadelförmige Kristalle und schmolz bei  $159\text{--}160^{\circ}\text{C}$ .

Analyse: (Bei  $100^{\circ}\text{C}$  unter 16 mm Druck über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet.)

0.29438 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0.02858 g N.

Für  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{10}\text{N}_4$  (556.256) berechnet N 10.07%,  
gefunden N 9.71%.

3 g Fumaryldiglycyltyrosin wurden in 24 ccm Ammoniak ( $d=0.90$ ) gelöst und in Druckflasche 3 Stunden auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Lösung wurde weiter unter vermindertem Druck getrocknet,

mit Barytlösung versetzt und wieder eingedampft, um das gebundene Ammoniak zu entfernen. Der gebrauchte Baryt betrug ein wenig mehr als die berechnete Menge, um die beiden Carboxylgruppen des Asparagyldiglycylytyrosins zu sättigen. Die stark konzentrierte Lösung war ammoniakfrei. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure quantitativ von Barium befreit und dann unter vermindertem Druck stark eingedampft. Das gesuchte Pentapeptid konnte aus dieser Lösung durch Abkühlung gewonnen werden. Der Niederschlag bildete anfänglich eine ölige Masse, die sich aber während des Aufbewahrens im Eisschrank in 3 Tagen in nadelförmige Kristalle umwandelte. Schmelzpunkt  $183^{\circ}\text{C}$ . Ausbeute 0.8 g.

Analyse: (Bei  $100^{\circ}\text{C}$  unter 16 mm Druck über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet.)

0.22854 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0.02760 g N.

0.15306 g Substanz lieferte nach Van Slyke 3.874 mg  $\text{NH}_2\text{-N}$ .

Für  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_{10}\text{N}_5$  (573.288) berechnet 12.20% N,

2.44%  $\text{NH}_2\text{-N}$ ;

gefunden 12.07% N,

2.53%  $\text{NH}_2\text{-N}$ .

## II. Fermentversuche.

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen wird in jedem Protokoll angegeben. Ein Teil davon diente zur elektrometrischen  $\text{pH}$ -Bestimmung. Die Versuchstemperatur war  $37^{\circ}\text{C}$ . Der  $\text{COOH}$ -Zuwachs wurde in zeitlich abpipettierten 5 ccm der Lösung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (1921) gemessen. 100%ige Hydrolyse bedeutet in den nachstehenden Protokollen die vollständige Hydrolyse einer  $\text{CO-NH}$ -Bindung des Pentapeptids. Das hydrolytische Prozent berechnet sich damit aus der titrierten  $n/5$  Alkalimenge. Die Kontrollversuche wurden jedesmal unter gleicher Azidität parallel ausgeführt. Das Substrat selbst war stabil sowohl bei  $\text{pH}$  2 als bei  $\text{pH}$  8. Die Fermentlösung zeigte einen kleinen Zuwachs der titrierbaren  $\text{COOH}$ . Dieser Wert wurde berücksichtigt, und die Hauptversuche wurden damit korrigiert.

A. *Pepsin.*

Substrat	0.30020 g	} $P_H$ 2.02
n-NaOH	0.3 ccm	
Wasser	9.7 ccm	
M/10 Glykokoll-HCl-Puffer (5:5)	5 ccm	
2% Pepsin (Grübler)	5 ccm	

Kein COOH-Zuwachs in 24 Stunden.

B. *Erepsin.*

Die Erepsinlösung wurde nach Rice (1915) aus Schweinsdarmschleimhaut dargestellt und dialysiert.

Substrat	0.1500 g	} $P_H$ 7.73
n-NaOH	0.1 ccm	
Wasser	9.9 ccm	
M/10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	5 ccm	
Erepsin	5 ccm	

Kein COOH-Zuwachs in 24 Stunden.

Die gebrauchte Erepsinlösung war, auf Glycylasparagin und Glycylglycin geprüft, sehr stark aktiv.

C. *Trypsin.*

Das Ferment wurde nach Waldschmidt-Leitz (1927) aus Schweinepankreaspulver hergestellt, war erepsinfrei und, auf Karminfibrin geprüft, nicht in aktivierter Form vorhanden.

Substrat	0.22460 g	} $P_H$ 8.03
n-NaOH	0.3 ccm	
Wasser	9.7 ccm	
M/10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 ccm	
Trypsin	6 ccm	

Kein COOH-Zuwachs in 24 Stunden.

D. *Trypsin + Enterokinase.*

Die Kinasenlösung wurde nach Waldschmidt-Leitz und Künstner (1927) aus Schweinsdarm hergestellt und war frei von Erepsin. Mit dieser Kinasenlösung wurde das Trypsin in

üblicher Weise aktiviert. Dieses aktivierte Trypsin verdaute das Karminfibrin sehr energisch.

Substrat	0.2460 g	} $P_H$ 8.02
n-NaOH	0.3 ccm	
Wasser	9.7 ccm	
M/10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 ccm	
Trypsin-KinaseLösung	6 ccm	

Zeit in Stunden	4	24
n/5-KOH Zuwachs in ccm	0.14	0.26
Hydrolysegrad	26.4%	49.1%

## LITERATUR.

- Fischer, E. (1904): Ber. d. deutsch. Chem. Ges., **37**, 2495.  
 Grassmann, W. (1928): Ber. d. deutsch. Chem. Ges., **61**, 656.  
 Rice, F. E. (1915): J. Americ. Chem. Soc., **37**, 1319.  
 Suzuki, K. (1931): J. of Biochem., **13**, 57.  
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Linderström-Lang, K. (1927): Zs. f. physiol. Chem., **166**, 245.  
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Willstätter, R. (1925): Zs. f. physiol. Chem., **142**, 223.  
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Künstner, G. (1927): Zs. f. physiol. Chem., **171**, 300.  
 Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E. (1921): Ber. d. deutsch. Chem. Ges., **54**, 2988.  
 Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E. (1923): Zs. f. physiol. Chem. **125**, 150.



Digitized by the Internet Archive  
in 2024

# ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER HÄMOGLYKOLYSE DURCH DIE NAHRUNG, MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER AVI- TAMINOTISCHEN DIÄT.

## II. Mitteilung.

### Die Verhältnisse zwischen der Abschwächung der Glykolyse und der Verteilung des freien und gebundenen Cholesterins im Kaninchenblute bei der Fütterung mit Cholesterin.

VON

JINJI CHIWAKI.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Akademie der Nihon-Daigaku,  
Tokyo. Vorstand: Prof. Dr. Z. Hatt a.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1932)

## I. EINLEITUNG.

In der ersten Mitteilung (Kawashima und Chiwaki, 1930) haben wir über den Einfluss des Cholesterins auf die Glykolyse des Kaninchenblutes nach vorgenommenen Untersuchungen berichtet, durch die wir die folgenden Ergebnisse erhielten:

Bei Verabreichung von cholesterinhaltiger Nahrung an Kaninchen zeigt das Gesamt-Cholesterin deutlich eine Zunahme, während zugleich die Glykolyse dabei eine Abnahme erfährt.

Diese Abschwächung der Glykolyse tritt sowohl beim Serum als auch in den Blutkörperchen auf; sobald man aber die Verabreichung des Cholesterinfutters einstellt, kommt die Abschwächung der Glykolyse im Serum zum Stillstand, auch die in den Blutkörperchen aufgetretene Verringerung der Glykolyse tritt allmählich zurück, und die Hämoglykolyse erreicht wieder ihren früheren Wert.

Bei der Verabfolgung von Lecithin tritt eine solche Abschwächung der Glykolyse nicht zutage; und die durch Fütterung mit Cholesterin verursachte Abschwächung der Glykolyse läuft

mit der Änderung der Gesamt-Cholesterinmenge des Blutes durchaus nicht parallel.

Da wir jedoch das freie Cholesterin und den Cholesterinester nicht getrennt von einander bestimmen konnten, vermochten wir die Frage nicht zu lösen, ob irgend welche Beziehungen zwischen dem freien Cholesterin und dem Cholesterinester einer- und der beobachteten Abschwächung der Glykolyse anderseits bestehen.

Wenn wir nun die bei der Fütterung der Versuchstiere mit Cholesterin bezüglich des Verteilungsverhältnisses zwischen Cholesterin und Cholesterinester, welche im Serum einer- und in den Blutzellen anderseits auftreten, früher gewonnenen experimentellen Resultate anderer Forscher heranziehen, so sind es die folgenden: Wacker und Hick (1913) haben, indem sie Kaninchen täglich 1,2 g Cholesterin ununterbrochen 126 bis 180 Tage lang verabfolgten, dabei die gesamte Blut-Cholesterinmenge über die normale Höhe um das Fünf- bis Zwölffache vermehrt gefunden; dabei haben sie in den Blutzellen eine besonders starke Zunahme des freien Cholesterins, im Serum hingegen ein um so erheblicheres Anwachsen des Cholesterin-Esters bemerkt. Knudson (1921) hat bei der Fütterung von Kaninchen mit Cholesterin beobachtet, dass im Blute derselben das freie Cholesterin eine Zunahme erfuhr, der Cholesterin-Ester hingegen sich nicht änderte.

Izawa (1925) hat, indem er täglich je 0,25 g Cholesterin Kaninchen per os verabfolgte, festgestellt, dass dabei die Gesamt-Cholesterinmenge im Blute eine Zunahme erfuhr und gleichzeitig auch die Menge des Cholesterin-Esters zunahm, und zwar so, dass der Letztere sogar eine noch erheblichere Zunahme als das freie Cholesterin zeigte. Im Serum weist zuerst das freie Cholesterin eine Zunahme auf, später wird dann aber die Menge des Cholesterin-Esters erheblicher. Es zeigt sich somit, dass die Meinungen der verschiedenen Autoren bezüglich dieser Dinge nicht mit einander übereinstimmen.

Ich habe nunmehr, um experimentell festzustellen, welches Verhältnis bei der Fütterung mit Cholesterin zwischen dem in den Blutzellen und dem Blutplasma vorkommenden freien Cholesterin und Cholesterinester besteht, sowie um die Frage zu lösen, welche

Beziehungen zwischen jenen Tatsachen und dem Mechanismus der Abschwächung der Hämoglykolyse obwalten, die im Folgenden beschriebenen experimentellen Untersuchungen vorgenommen und will nunmehr darlegen, welche Ergebnisse ich bei diesen Untersuchungen erzielt habe.

## II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

In ganz gleicher Weise, wie wir es bereits in unserer ersten Mitteilung geschildert haben, habe ich Kaninchen bestimmt eingeteilte Nahrungsmengen zugeführt (nämlich pro kg Körpergewicht je 100 g Bohnenquark-Treber, ein wenig "Komatsuna" — eine Krautart — und Mohrrübe). Morgens wurde bei noch nüchternem Zustande der Tiere deren Körpergewicht gewogen, die Glykolyse, der Cholesteringehalt, sowie der Blutzucker gemessen; diese Messungen dienten zum Zwecke der Kontrolle.

Der vorstehend beschriebenen Diät wurde nun Cholesterin (Merck) beigemischt, und auf diese Weise einer Gruppe von Kaninchen Cholesterin im Verhältnis von 1 g auf je 1 kg Körpergewicht, einer andern aber eine viel kleinere Menge Cholesterin, 0,5 g pro die, verabfolgt; diesen Kaninchen wurde dann jede Woche einmal Blut entnommen, die oben erwähnten Verhältnisse wurden untersucht und mit der Kontrolle verglichen. Die Manipulationen betreffs der Glykolyse wurden ganz aseptisch durchgeführt, indem die Sauberkeit nach der Beendigung der Experimente durch ärobe und anärobe Kulturen festgestellt wurde. Bei der Zuckerbestimmung habe ich mich des Mikro-Verfahrens von Bang bedient und zur Feststellung des Cholesterins mit Hilfe von Windau's Digitoninmethode erst das freie Cholesterin, und nachdem das Alkoholätherextrakt des Blutes verseift worden war, durch Anwendung der Digitoninmethode das Gesamt-Cholesterin bestimmt. Aus der Differenz zwischen dem Gesamt-Cholesterin und dem freien Cholesterin wurde die Menge des Cholesterin-Esters festgestellt. Diese Verfahren sind auf Vollblut und Zitratplasma angewendet worden; und mit Hilfe des Volumenverhältnisses zwischen den Blutzellen und dem Blutplasma wurde der Cholesteringehalt der Blutzellen bestimmt.

## III. ERGEBNISSE DER EXPERIMENTE.

## A. Bei Verabfolgung von je 1 g Cholesterin pro 1 kg Körpergewicht.

Wie sich in der ersten Tabelle zeigt, wird in der *ersten Woche* bei Verfütterung von Cholesterin allmählich die Hämoglykolyse abgeschwächt; mit der Kontrolle verglichen, weisen die Fälle von No. 1 bis No. 5 der Reihe nach die folgenden Abschwächungsgrade auf:

23,4%, 24,7%, 20,0%, 22,0%, und 37,6%.

Wenn wir nun während dieser Periode das Verteilungsverhältnis der Cholesterinzunahme genau betrachten, so zeigen im Verhältnis zur Kontrolle das freie Cholesterin sowie auch das gebundene Cholesterin des Blutplasmas, indem die Fälle 1–5 der Reihe nach 6,2-fache und 5,5-fache, 7,9-fache und 4,5-fache, 8,1-fache und 2,0-fache, 10,1-fache und 3,6-fache, 7,5-fache und 5,2-fache Vermehrung zeigen, im Durchschnitt eine Vermehrung auf das 7,8- bzw. 4,2-fache.

Das freie und gebundene Cholesterin der Blutkörperchen zeigt die folgenden Vermehrungsgrade: 1,6- und 8,7-fach; 1,2- und 2,1-fach; 1,7- und 4,1-fach; 1,1- und 9,6-fach; 9,6-fach; 1,5- und 2,8-fach; im Durchschnitt also eine Vermehrung auf das 1,5- bzw. 4,5-fache.

Im Blutplasma zeigt sich nämlich eine grössere Zunahme des freien Cholesterins, aber in den Blutzellen eine grössere Vermehrung des Cholesterinesters; und aus diesem Grunde ist die Verhältniszahl zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin in allen Fällen beim Plasma gegenüber der Kontrolle klein, in den Blutzellen jedoch grösser (Tabelle II).

*Zweite Woche:* In dieser Zeit tritt die Abschwächung der Glykolyse nach und nach stärker in die Erscheinung; in den Fällen No. 1 – No. 5 zeigt sich der Reihe nach eine solche Abnahme um bzw. 38,6%, 46,2%, 31,9%, 35,3% und 35,9%. In dieser Zeit erfahren das freie und gebundene Cholesterin im Blutplasma in allen Fällen eine Zunahme, nämlich auf das 9,2- und 8,9-, 21,3- und 6,8-, 9,7- und 5,0-, 20,6- und 10,3-, 17,0- und 8,0-fache, woraus

sich eine durchschnittliche Zunahme auf das 13,1- und 7,9-fache ergibt. Auch das freie und gebundene Cholesterin der Blutzellen zeigt gleichzeitig Zunahmen auf das 1,5- und 14,3-fache, das 2,4- und 4,7-fache, das 2,3- und 6,0-fache; das 2,5- und 22,2-fache, und das 2,0- und 11,5-fache; im Durchschnitt eine Zunahme auf den 2,3-fachen bzw. 10,4-fachen Wert. Mithin erfahren beim Blutplasma das freie und das gebundene Cholesterin beiderseits eine Zunahme, wobei allerdings zuweilen das freie, und zuweilen wieder das gebundene Cholesterin überwiegt; aber im Durchschnitt der fünf Fälle stellt sich doch das Vermehrungsverhältnis beider ziemlich gleich. Bei den Blutzellen erfährt gegenüber dem freien Cholesterin das gebundene eine stärkere allmähliche Zunahme; dabei ist das betreffende Verhältnis im Blutplasma während der ersten Woche im allgemeinen noch gleich dem bei der Kontrolle, wächst sich aber danach allmählich zu immer grösserer Verschiedenheit aus.

*Dritte Woche:* Die Abschwächungsgrade der Hämoglykolyse zeigen sich in den einzelnen Fällen als 30,1%, 41,3%, 34,6%. Das freie und gebundene Cholesterin im Blutplasma hat sich dabei um das 13,7- und 7,0-fache, das 23,2- und 12,5-fache, das 12,9- und 5,9-fache vervielfältigt, was im Durchschnitt der Fälle eine Zunahme auf das 16,0- bzw. 8,6-fache bedeutet. Das freie und das gebundene Cholesterin der Blutzellen nahm um das 1,5- und 17,0-fache, das 2,6- und 8,3-fache und das 2,3- und 10,3-fache zu, woraus sich eine durchschnittliche Zunahme desselben auf den 2,1-fachen bzw. 11,3-fachen Wert ergibt. Mithin zeigt beim Blutplasma das freie sowie das gebundene Cholesterin fast den gleichen Grad der Zunahme; in den Blutzellen weist das freie Cholesterin das gleiche Verhältnis wie in der vorhergehenden Woche auf, während hier das gebundene Cholesterin deutlich eine mehr oder weniger ausgeprägte Zunahme zeigt. Daraus folgt, dass das Verhältnis zwischen dem Ester und dem gesamten Cholesterin beim Plasma dasselbe wie in der vorhergehenden Woche bleibt und nur geringer als beim Kontrollversuche ausfällt, während sich in den Blutzellen noch geringere Zunahmewerte als in der vorhergehenden Woche ergeben.

TABELLE I.

Nummer der Fälle	Datum	Verlauf	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme in mg		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (mill.)	Cholesteringehalt in mg %			Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	zu 100 cem	zu 1 + 10 <sup>5</sup> mill. Erythrozyten			Gesamtcholesterin	Freies Cholesterin	Cholesterin-ester	
1.	20. II.	Kontrolle	767	449	315	46,1		6,832	141	88	43	Seit 24. II. Cholesterin gegeben.  Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht.  Seit 16. III. Cholesterin ausgesetzt.
	2. III.	1. W.	466	230	236	35,3	23,3	6,680	563	234	329	
	9.	2. W.	337	184	153	28,6	38,6	5,400	828	295	531	
	16.	3. W.	602	457	145	32,2	30,1	4,500	894	391	503	
	22.	1. W.*	508	294	214	32,9	28,6	6,496	625	263	362	
	29.	2. W.	370	71	299	42,5		7,040	313	200	113	
2.	21. II.	Kontrolle	542	247	295	46,3		6,368	147	94	53	Seit 25. II. Cholesterin gegeben.  Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht.  Seit 17. III. Cholesterin ausgesetzt.
	3. III.	1. W.	514	295	219	34,9	24,7	6,280	469	250	219	
	10.	2. W.	663	509	154	24,8	46,2	6,200	1000	625	375	
	17.	3. W.	425	262	163	27,2	41,3	6,000	1363	681	748	
	24.	8. T.*	436	254	182	29,2	36,9	6,240	813	462	351	
	31.	15. T.	437	191	246	40,0		6,144	581	388	193	

3.	22. II.	Kontrolle	439	140	299	44,5		6,720	125	78	47	Seit 20. II. Cholesterin gegeben. Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 19. III. Cholesterin ausgesetzt.
	5. III.	1. W.	532	321	211	34,8	22,0	6,064	360	231	129	
	12.	2. W.	493	297	199	30,3	31,9	6,560	553	406	147	
	19.	3. W.	656	462	190	29,1	34,6	6,520	703	375	328	
	25.	1. W.*	815	644	171	30,1	22,0	5,688	547	234	313	
	1. IV.	2. W.	565	335	230	40,5		5,680	375	194	345	
4.	23. II.	Kontrolle	595	306	290	43,1		6,734	134	84	50	Seit 23. II. Cholesterin gegeben. Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 14. III. Cholesterin ausgesetzt.
	6. III.	1. W.	486	282	204	33,6	22,0	6,070	469	281	188	
	13.	2. W.	535	352	183	27,9	35,3	6,558	1163	531	632	
	20.	1. W.*	777	570	207	32,5	24,4	6,400	688	438	250	
	27.	2. W.	439	140	299	44,5		6,720	469	259	210	
5.	24. II.	Kontrolle	366	93	273	41,2		6,620	168	109	59	Seit 1. III. Cholesterin gegeben. Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 14. III. Cholesterin ausgesetzt.
	7. III.	1. W.	427	283	144	25,7	37,6	5,600	588	340	248	
	13.	2. W.	366	201	165	26,4	35,9	6,240	1200	650	550	
	20.	1. W.*	436	224	212	33,1	19,7	6,400	688	450	238	
	27.	2. W.	593	338	265	42,5		6,240	343	250	93	

\* nach Cholesterinaussetzung

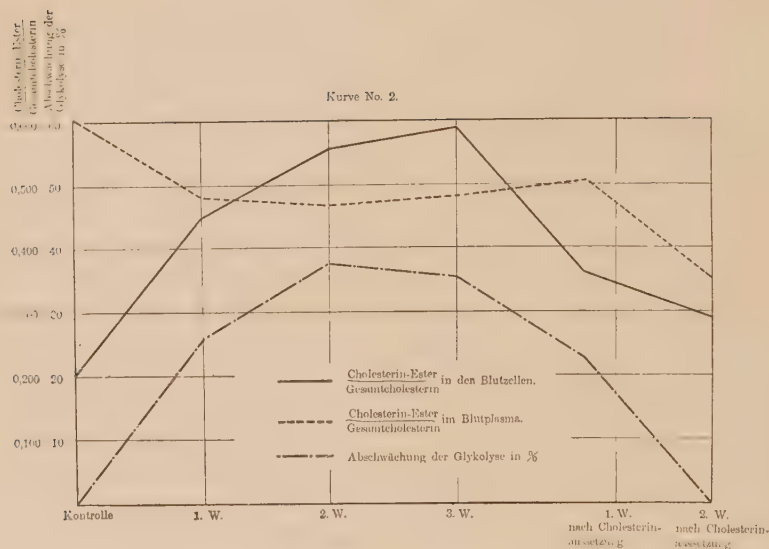
F. = freies Cholesterin  
E. = Cholesterinester  
G. = Gesamtcholesterin

TABLE II.

Verlauf	Nummer der Fälle	Blutkörperchen						Blutplasma						Abschätzung der Glykolyse in %	
		Gesamt-cholesterin in mg %			Cholesterinester			Freies Cholesterin			Cholesterinester				Freies Cholesterin
		in mg %	Grad der Zunahme in-fach	E. / G.	in mg %	Grad der Zunahme in-fach	F. / G.	Gesamt-cholesterin in mg %	in mg %	Grad der Zunahme in-fach	F. / G.	in mg %	Grad der Zunahme in-fach	F. / G.	Glykolytische Kraft in mg
Kontrolle	1.	180	30	0,161	150		0,839	109	71		0,651	38		0,349	46,1
	2.	193	57	0,295	136		0,705	109	68		0,624	41		0,376	46,3
	3.	163	29	0,179	133		0,821	94	63		0,669	31		0,331	44,5
	4.	171	21	0,122	150		0,878	103	72		0,700	31		0,300	43,1
	5.	231	53	0,229	178		0,771	116	63		0,543	53		0,477	41,2
	Durchschnitt	188	38	0,202	139		0,798	106	67		0,604	39		0,396	44,2
I. W.	1.	494	261	8,7	233	1,6	0,472	625	391	5,5	0,626	234	6,2	0,374	35,3
	2.	282	119	2,1	163	1,2	0,578	625	303	4,5	0,485	322	7,9	0,515	34,9
	3.	342	120	4,1	222	1,7	0,778	375	125	2,0	0,333	250	8,1	0,667	34,8
	4.	364	201	9,6	163	1,1	0,837	572	259	3,6	0,453	313	10,1	0,547	33,6
	5.	416	149	2,8	267	1,5	0,442	728	328	5,2	0,450	400	7,5	0,550	25,7
	Durchschnitt	380	170	4,5	210	1,5	0,553	585	281	4,2	0,479	304	7,8	0,521	32,9

2. W.	1.	664	440	14,3	0,663	224	1,5	0,337	984	634	8,9	0,644	350	9,2	0,356	28,3	38,6
	2.	593	268	4,7	0,452	325	2,4	0,548	1340	465	6,8	0,347	875	21,3	0,653	24,8	46,2
	3.	497	188	6,0	0,378	309	2,3	0,622	609	309	5,0	0,507	300	9,7	0,493	30,3	31,9
	4.	835	465	22,2	0,555	370	2,5	0,445	1381	743	10,3	0,530	638	20,6	0,440	27,9	35,3
	5.	960	610	11,5	0,635	350	2,0	0,365	1400	500	8,0	0,357	900	17,0	0,643	26,4	35,9
	Durchschnitt	710	394	10,4	0,555	316	2,3	0,445	1143	530	7,9	0,464	613	13,1	0,536	27,5	37,6
3. W.	1.	736	511	17,0	0,698	221	1,5	0,302	1016	497	7,0	0,489	519	13,7	0,511	32,2	30,1
	2.	829	473	8,3	0,571	356	2,6	0,429	1800	850	12,5	0,472	950	23,2	0,528	27,2	41,3
	3.	600	300	10,3	0,500	300	2,3	0,500	772	372	5,9	0,482	400	12,9	0,518	29,1	34,6
	Durchschnitt	722	428	11,3	0,590	292	2,1	0,410	1194	573	8,6	0,480	623	16,0	0,520	29,5	35,3
1. W. nach der Cho- leste- rinaus- setzung	1.	212	62	1,9	0,292	150	1,0	0,708	1094	750	10,5	0,688	344	9,1	0,312	32,9	28,6
	2.	584	231	4,0	0,396	353	2,6	0,604	1000	450	6,6	0,450	550	13,4	0,550	29,2	36,9
	3.	470	236	8,2	0,502	234	1,8	0,498	594	360	5,4	0,603	234	7,5	0,394	30,1	32,4
	4.	436	74	3,5	0,170	362	2,4	0,830	876	367	5,2	0,429	500	16,1	0,571	32,5	24,4
	5.	566	215	4,1	0,379	351	2,0	0,621	788	257	4,1	0,326	531	10,0	0,674	33,1	19,7
	Durchschnitt	454	164	4,3	0,361	290	2,1	0,639	870	439	6,6	0,505	422	10,8	0,495	31,6	22,7
2. W.	1.	160	22	0,7	0,138	188	1,3	0,862	438	113	2,6	0,429	250	6,5	0,571	42,5	
	2.	360	109	1,9	0,302	251	1,8	0,698	762	262	3,9	0,344	500	12,2	0,656	40,0	
	3.	245	81	2,8	0,331	265	2,0	0,669	484	164	2,6	0,548	219	7,1	0,452	40,5	
	4.	382	73	3,5	0,191	309	2,0	0,809	538	319	4,4	0,596	219	7,1	0,404	44,5	
	5.	311	51	1,0	0,164	260	1,5	0,836	369	128	2,0	0,347	241	4,5	0,653	42,5	
	Durchschnitt	292	67	1,8	0,229	255	1,8	0,771	518	189	2,8	0,360	286	7,3	0,639	42,0	

Fig. 1.



Während der *ersten nach der Einstellung der Cholesterin-fütterung verflassenen Woche* beläuft sich die Abschwächung der Hämoglykolyse in den einzelnen drei Fällen auf 28,6%, 36,9% und 32,4%; dabei weist auch die glykolytische Kraft keine deutlich wahrnehmbare Erholung auf; dagegen ist in den Fällen No. 4 und No. 5, bei denen die Abschwächung der Glykolyse 24,5% und 19,7% beträgt, eine unzweifelhafte Erholung in Erscheinung getreten. Das freie und gebundene Cholesterin zeigen in dieser Zeit eine 9,1- und 10,5-fache, 13,4- und 6,6-fache, 7,5- und 5,4-fache 16,1- und 5,2-fache, sowie 10,0- und 4,1-fache Zunahme; im Durchschnitt beläuft sich diese Zunahme auf das 10,8- bzw. 6,6-fache. Das freie und gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen zeigt sich 1,0- und 1,9-fach, 2,6- und 4,0-fach, 1,8- und 8,2-fach, 2,4- und 3,5-fach, sowie 2,0- und 4,1-fach vermehrt; im Durchschnitt erfahren beide Vermehrungen auf das 2,1- bzw. 4,3-fache. Mithin zeigen beim Blutplasma beide Arten von Cholesterin eine noch höhere Abnahme, als sie in der vorhergehenden Woche erfolgte; indessen nimmt dabei das freie Cholesterin in noch stärkerem Grade ab als der Ester. Bei den Blutzellen ist

zwar auch eine gewisse Neigung zur Abnahme des freien Cholesterins wahrzunehmen, aber eine ganz deutliche Verringerung zeigt hier das gebundene Cholesterin; und das Verhältnis des gebundenen zum Gesamt-Cholesterin ist beim Plasma im allgemeinen grösser als während der vorhergehenden Woche, wobei allerdings die Verschiedenheit noch geringer bleibt als die, welche sich gegenüber der Kontrolle ergibt. Aber je nach den einzelnen Fällen sind diese Verhältnisse gewissen Schwankungen unterworfen. Bei den Blutzellen ist dieser Unterschied geringer als während der vorhergehenden Woche, doch verglichen mit der Kontrolle noch recht erheblich.

*Zweite Woche nach der Einstellung der Cholesterinfütterung:* In dieser Woche zeigt die Hämoglykolyse Erholung, was sich beim Vergleich mit den entsprechenden Werten bei der Kontrolle erkennen lässt. Das freie und gebundene Cholesterin im Blutplasma zeigt in den einzelnen Fällen Zunahmen auf das 6,5- und 2,6-fache, das 12,2- und 3,9-fache, das 7,1- und 2,6-fache, das 7,1- und 4,4-fache, und das 4,5- und 2,0-fache; im Durchschnitt ergeben sich für beide Zunahmen von 7,3 bzw. 2,8-mal. Das freie und gebundene Cholesterin in den Blutzellen zeigt Zunahmen auf das 1,3- und 0,7-fache, 1,8- und 1,9-fache, 2,0- und 2,8-fache, 2,0- und 3,5-fache, 1,5- und 1,0-fache; im Durchschnitt eine Zunahme auf den 1,8- und 1,8-fachen Wert. Die absoluten Mengen beider sind zwar noch grösser als bei der Kontrolle; aber von dem Unterschiede zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin aus betrachtet, zeigt dieses verglichen mit der Kontrolle noch einen geringeren Wert, ist hingegen bei den Blutzellen dieser fast gleich.

Bei den Blutzellen hat sich also seit der Einstellung der Cholesterinfütterung rasch eine Abnahme des gebundenen Cholesterins gezeigt; und während der zweiten seit der Einstellung verlaufenen Woche wird das Verhältnis zwischen dem freien und dem gebundenen Cholesterin fast das gleiche.

Im Blutplasma nehmen beide Arten von Cholesterin gleichmässig ab, aber indem der Ester eine besonders erhebliche Abnahme erfährt, wird das Verhältnis zwischen dem freien und dem gebundenen Cholesterin, das in der Kontrolle 0,58 betragen hatte, jetzt

TABELLE III.

Nummer der Fälle	Datum	Verlauf	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme in mg		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (mill.)	Cholesteringehalt in mg %			Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	zu 100 cem	zu 1 × 10 <sup>6</sup> mill. Erythrozyten			Gesamtcholesterin	Freies Cholesterin	Cholesterin ester.	
1.	26. XI.	Kontrolle 1. W.	607	273	334	47,4		7,040	104	77	27	Kontrolle. Seit 29. XI. Cholesterin gegeben.
	5. XII.		653	386	267	40,0		6,600	181	125	56	
	13.	2. W.	515	382	233	38,3	19,2	6,080	203	138	65	Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 26. XII. Cholesterin ausgesetzt.
	19.	3. W.	579	293	186	31,8	32,9	5,820	495	262	233	
	26.	4. W.	535	352	183	32,8	30,8	5,600	575	281	294	
2.	7. I.	8. T.*	406	176	230	37,0	21,9	6,208	491	250	241	Kontrolle Seit 25. XII. Cholesterin gegeben.
	25. XI.	Kontrolle 1. W.	418	192	226	40,4		5,600	115	83	32	
	1. XII.		456	170	286	42,1		6,800	233	150	83	Ein Teil jeden Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 25. XII. Cholesterin ausgesetzt.
	8. XII.	2. W.	397	225	172	30,0	25,7	5,760	280	175	105	
	15.	3. W.	743	588	155	26,4	34,7	5,856	313	180	133	
3.	22.	4. W.	716	535	181	31,3	22,5	5,776	531	331	200	Kontrolle Seit 27. XII. Cholesterin gegeben.
	7. I.	14. T.*	512	222	290	44,1		6,584	344	219	125	
	21. XI.	Kontrolle 1. W.	658	410	248	44,9		5,520	188	109	79	Seit 27. XII. Cholesterin gegeben.
	3. XII.		466	197	269	40,7		6,608	375	281	94	
	10.	2. W.	477	211	266	39,1	14,8	6,800	547	319	228	
	17.	3. W.	426	200	226	33,4	25,6	6,760	800	500	300	

4.	24. XII. 6. I.	4. W. 2. W.*	672 385	533 162	139 223	24,1 36,0	44,9 20,0	5,678 6,200	906 531	531 319	375 212	Ein Teil jedes Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 24. XII. Choles- terin ausgesetzt.
	8. I. 17.	Kontrolle 1. W.	654 563	392 307	262 256	42,0 40,0		6,236 6,400	156 250	94 94	62 156	Seit 11. I. Cholesterin gegeben.
5.	24. 31.	2. W. 3. W.	754 737	517 545	237 192	84,8 30,0	17,1 28,6	6,816 6,400	359 759	156 172	203 587	Ein Teil jedes Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 3. II. Cholesterin ausgesetzt.
	9. II. 19.	1. W.* 17. T.	679 783	495 502	184 281	28,4 45,0	30,0	6,486 6,240	713 300	297 181	416 119	
6.	10. I. 19.	Kontrolle 1. W.	595 523	306 246	290 280	43,1 40,0		4,500 7,000	134 331	84 250	50 81	Seit 13. I. Cholesterin gegeben.
	26. 2. II. 8. 15.	2. W. 3. W. 1. W.* 2. W.	676 736 644 565	452 569 462 335	224 167 182 230	34,1 26,9 30,3 40,5	20,9 37,6 29,7	6,568 6,200 6,000 5,680	578 625 500 240	334 300 288 191	244 325 212 50	Ein Teil jedes Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 2. II. Cholesterin ausgesetzt.
6.	12. I. 21.	Kontrolle 1. W.	783 466	502 230	281 236	45,0 35,3		6,240 6,680	156 281	109 200	47 81	Seit 15. I. Cholesterin gegeben.
	28. 4. II. 10. 17.	2. W. 3. W. 1. W.* 2. W.	617 815 428 595	436 644 228 303	181 171 200 289	27,5 25,2 32,6 43,1	38,9 44,0 26,9	6,576 6,800 6,088 6,731	588 650 431 313	350 375 250 181	138 275 181 132	Ein Teil jedes Blutes zum Kreuzversuch gebraucht. Seit 4. II. Cholesterin ausgesetzt.

\* nach Cholesterinaussetzung.

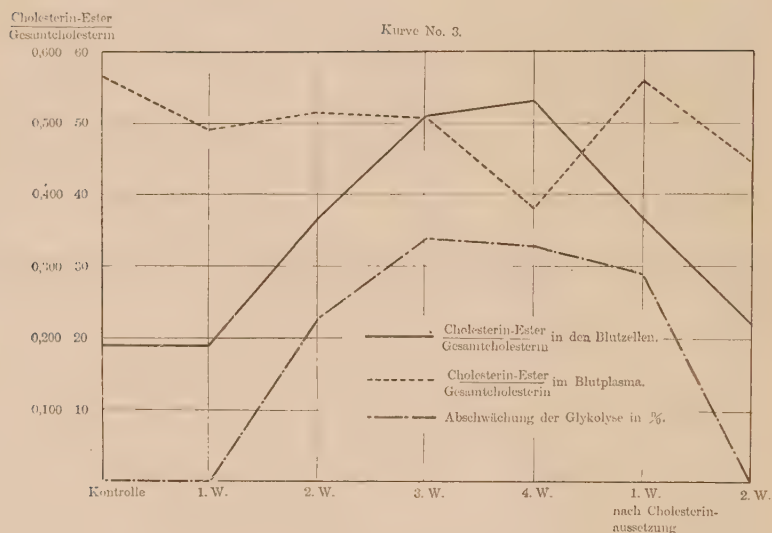
F. = Freies Cholesterin  
E. = Cholesterinester  
G. = Gesamtcholesterin

TABELLE IV.

Ver- lauf	Nummer der Fälle	Blutkörperchen						Blutplasma						Glykolytische Kraft in mg	Abschwächung der Glykolyse in %
		Gesamt- cholesterin in mg %	Cholesterinester			Freies Cholesterin			Gesamt- cholesterin in me %	Cholesterin			Freies Cholesterin		
			in mg %	Grad der Zunahme in-fach	E. G.	in mg %	Grad der Zunahme in-fach	F. G.		in mg %	Grad der Zunahme in-fach	E. G.	in mg %	Grad der Zunahme in-fach	F. G.
Kon- trolle	1.	150	10		0,067	144		0,933	72	37		0,514	35		0,485
	2.	148	10		0,068	138		0,932	94	48		0,511	46		0,489
	3.	213	56		0,260	157		0,740	172	94		0,517	78		0,453
	4.	265	98		0,370	167		0,630	63	32		0,508	31		0,492
	5.	171	21		0,122	150		0,878	103	72		0,700	31		0,300
	6.	202	18		0,089	184		0,911	119	72		0,605	47		0,395
	Durch- schnitt	192	36		0,188	157		0,812	104	59		0,567	45		0,433
1. W.	1.	178	22	2,2	0,124	156	1,1	0,876	181	81	2,3	0,456	100	2,9	0,544
	2.	187	14	1,4	0,075	173	1,3	0,925	270	139	2,9	0,514	131	2,8	0,486
	3.	303	58	1,1	0,191	245	1,6	0,809	172	125	1,3	0,285	313	4,0	0,715
	4.	174	42	0,4	0,241	132	0,8	0,759	313	250	7,8	0,799	63	2,0	0,202
	5.	215	42	2,0	0,195	176	1,2	0,805	425	112	1,6	0,264	313	10,0	0,736
	6.	214	64	3,6	0,299	150	0,8	0,701	334	93	1,3	0,278	241	5,1	0,722
	Durch- schnitt	212	40	1,1	0,189	172	1,1	0,812	283	139	2,4	0,492	191	4,3	0,508
	1.	155	31	3,1	0,200	124	0,9	0,800	241	91	2,5	0,378	150	4,3	0,622
	2.	222	38	3,8	0,170	185	1,3	0,830	319	150	3,1	0,470	169	3,7	0,530
	3.	427	159	2,8	0,372	268	1,7	0,622	641	282	3,0	0,440	359	4,6	0,560

2. W.	4.	325	125	1,3	9,385	200	1,2	0,615	391	257	8,9	0,657	134	4,3	0,343	34,8	17,1
	5.	440	241	11,5	0,525	209	1,3	0,475	690	447	6,2	0,635	253	8,2	0,365	34,1	20,9
	6.	461	150	8,3	0,323	291	1,6	0,677	700	300	4,2	0,429	400	8,5	0,571	27,5	38,9
	Durchschnitt	338	124	3,4	0,337	213	1,4	0,633	497	255	4,3	0,513	244	5,5	0,487	34,0	22,8
3. W.	1.	355	141	14,1	0,397	214	1,5	0,603	605	305	8,3	0,505	300	8,6	0,495	31,8	32,9
	2.	183	47	4,7	0,258	136	1,0	0,743	400	187	3,9	0,468	213	4,6	0,532	26,4	34,7
	3.	671	271	4,8	0,404	400	2,5	0,596	906	325	3,5	0,359	581	7,5	0,641	33,4	25,6
	4.	667	486	5,0	0,729	181	1,1	0,271	844	681	21,3	0,807	163	5,3	0,193	30,0	28,6
	5.	407	236	11,2	0,584	171	1,1	0,416	813	407	5,7	0,501	406	13,1	0,499	26,9	37,6
	6.	437	204	11,3	0,467	233	1,3	0,533	831	331	4,6	0,398	500	10,5	0,602	25,2	44,0
	Durchschnitt	453	231	6,4	0,510	223	1,4	0,527	733	373	6,3	0,509	361	8,0	0,491	29,0	33,9
4. W.	1.	502	300	30,0	0,598	202	1,4	0,402	625	300	8,1	0,480	325	9,3	0,520	32,8	30,8
	2.	429	211	21,0	0,492	218	1,6	0,508	594	194	4,0	0,327	400	8,7	0,673	31,3	22,5
	3.	903	468	8,4	0,517	438	2,8	0,483	906	312	3,3	0,344	594	7,5	0,656	24,1	44,9
	Durchschnitt	612	326	9,1	0,533	286	1,8	0,467	708	269	4,6	0,380	440	9,8	0,620	29,4	32,7
1. W. nach der Cholesterinaussetzung	1.	377	214	21,4	0,538	163	1,1	0,432	578	261	7,1	0,454	316	9,0	0,546	37,0	21,9
	4.	521	156	1,6	0,299	305	2,2	0,701	891	657	20,5	0,735	234	7,6	0,265	28,4	30,0
	5.	362	111	5,3	0,307	251	1,7	0,693	613	297	4,1	0,479	319	10,3	0,521	30,3	29,7
	6.	233	66	3,7	0,283	167	0,9	0,717	581	269	3,7	0,463	312	6,6	0,537	32,9	26,9
	Durchschnitt	373	137	3,8	0,337	237	1,5	0,633	666	371	6,1	0,557	285	6,3	0,443	32,2	23,9
2. W.	2.	409	95	9,6	0,235	313	2,3	0,765	291	150	3,1	0,516	141	3,1	0,494	44,1	
	3.	415	95	1,7	0,229	320	2,0	0,771	625	281	3,0	0,440	319	4,1	0,560	36,0	20,0
	4.	178	54	0,6	0,303	124	0,7	0,697	400	180	5,6	0,450	220	7,1	0,550	45,9	
	5.	190	31	1,5	0,163	169	1,1	0,837	281	72	1,6	0,256	209	6,7	0,744	40,5	
	6.	218	45	2,5	0,206	173	0,9	0,794	391	203	2,8	0,519	188	4,1	0,481	43,1	
	Durchschnitt	282	64	1,8	0,227	220	1,4	0,773	398	177	3,0	0,445	215	4,8	0,545	42,1	

Fig. 2.



zu dem Werte 1,53, ist also dreifach grösser geworden.

### B. Bei täglicher Verabfolgung von 0,5 g Cholesterin.

Was die Tabellen III und IV zeigen, ist der beobachtete Verlauf von 6 Fällen.

Während der *ersten Woche* ist bei den Fällen 1–5 im allgemeinen keine Abschwächung der Hämoglykolyse eingetreten; nur im Falle 6 zeigt sich solch eine Abschwächung im Betrage von 21.6%. Das freie und gebundene Cholesterin im Plasma zeigt in den einzelnen Fällen eine 2,9- und 2,3-fache, eine 2,8- und 2,9-fache, eine 4,0-fache und 1,3-fache, eine 2,0-fache und 7,8-fache, eine 10,0-fache und 1,6-fache, sowie 5,1- und 1,3-fache Zunahme, im Durchschnitt haben beide um das 4,3-fache bzw. 2,4-fache zugenommen. Das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin, im Blutplasma, das in der Kontrollzeit 0,567 betragen hatte, ist jetzt zu 0,492 geworden. In den Blutzellen war dies Verhältnis in der Kontrolle gleich 0,188 gewesen, ist jetzt aber zu 0,189 geworden. Mithin hat im Blutplasma das freie Cholesterin im allgemeinen

zugenommen; in den Blutzellen zeigen beide Arten von Cholesterin eine ungefähr gleichgradige Zunahme. Hierbei ist es von Interesse, dass der während der ersten Woche eine Abschwächung der Hämoglykolyse aufweisende Fall No. 6 eine Zunahme des Estergehaltes der Blutzellen aufweist, und zwar eine solche um das 3,6-fache, viel mehr in die Augen springend als dies in den andern fünf Fällen sichtbar ist. Das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin hatte sich also von 0,089 bei der Kontrolle auf 0,299 gesteigert; es ist daher auf die 3,4-fache Höhe angewachsen.

*Zweite Woche:* Die Abschwächung der Hämoglykolyse in den einzelnen Fällen No. 1 – No. 5 beträgt 19,2%, 25,7%, 14,8%, 17,1%, 20,9%; im Falle 6 zeigt sich eine besonders erhebliche Abschwächung, nämlich um 38,9%.

Das freie und das gebundene Cholesterin im Plasma hat um das 4,3-fache und 2,5-fache, das 3,7- und 3,1-fache, das 4,6- und 3,0-fache, das 4,3- und 8,0-fache, das 8,2- und 6,2-fache, sowie um das 8,5- und 4,2-fache zugenommen; im Durchschnitt ist mithin eine Zunahme auf das 5,5- und 4,3-fache erfolgt. Das freie und gebundene Cholesterin in den Blutzellen ist 0,9- und 3,1-fach, 1,3- und 3,8-fach, 1,7- und 2,8-fach, 1,2- und 1,3-fach, 1,3- und 11,5-fach, sowie 1,6- und 8,3-fach angewachsen, was einer durchschnittlichen Zunahme um das 1,4- bzw. 3,4-fache entspricht. Das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin beträgt nämlich beim Plasma durchschnittlich 0,513; es ist gegenüber der vorhergehenden Woche erheblich gewachsen, aber doch noch geringer als der entsprechende Wert der Kontrolle. Bei den Blutzellen ist derselbe Durchschnitt auf 0,367 angewachsen, ist also hierselbst doppelt so gross wie in der vorhergehenden Woche.

*Dritte Woche:* In den sechs untersuchten Fällen betragen die Prozente der Abschwächung der Hämoglykolyse der Reihe nach 32,9%, 34,7%, 25,6%, 28,6%, 37,6% und 44,0%. Beim Blutplasma beträgt die Zunahme des freien und gebundenen Cholesterins in den einzelnen Fällen: das 8,6- und 8,3-fache, das 4,6- und 3,9-fache, das 7,5- und 3,5-fache, das 5,3- und 21,3-fache, das 13,1- und 5,7-fache, das 10,6- und 4,6-fache; im Durchschnitt war die Menge 8,0 bzw.

6,3-mal so gross wie vorher geworden. Gleichzeitig hatte das freie und das gebundene Cholesterin in den Blutzellen Zunahmen auf das 1,5- und 14,1-fache, das 1,0- und 4,7-fache, das 2,5- und 4,8-fache, das 1,1- und 5,0-fache, das 1,1- und 11,2-fache, das 1,3-fache und 11,3-fache erfahren; sie waren im Durchschnitt um das 1,4- und 6,4-fache gewachsen. Das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin beträgt beim Plasma im Durchschnitt 0,0509, was fast der gleiche Wert wie in der Vorwoche ist. Bei den Blutzellen beläuft sich dieses Verhältnis durchschnittlich auf 0,510; hier hat der Ester allmählich zugenommen; dagegen hat sich im Blutplasma das freie Cholesterin noch stärker vermehrt als der Ester; und besonders ist dies während der zweiten Woche der Fall. Wenn man daher von der Betrachtung des Verhältnisses des freien Cholesterins zum Ester in der dritten Woche ausgeht, so hatte dieses beim Plasma in der Kontrolle 0,76 betragen, ist aber jetzt zu 0,97 angewachsen; dahingegen hatte es bei den Blutzellen die Zahl 4,36 aufgewiesen, ist daselbst aber jetzt zu 0,97 geworden, hat sich also verringert.

*Vierte Woche:* Während der vierten Woche wurde die Abschwächung der Hämoglykolyse weiter verfolgt; als Grade für dieselbe wurden die Zahlen 30,8%, 22,5% und 44,9% gefunden. Betreffs des freien und gebundenen Cholesterins im Plasma fanden sich Zunahmen um das 9,3- und 8,1-fache, das 8,7- und 4,0-fache, das 7,6- und 3,3-fache; im Durchschnitt hatten beide Zunahmen auf ihren 9,8- bzw. 4,6-fachen Wert gezeigt. Das freie und das gebundene Cholesterin in den Blutzellen zeigte sich in den drei Fällen 1,4- und 30,0-fach, 1,6- und 21,1-fach, 2,8- und 8,4-fach vermehrt; im Durchschnitt ergab sich also für beide eine 1,8- bzw. 9,1-fache Zunahme. Das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamt-Cholesterin betrug beim Plasma im Durchschnitt 0,380, bei den Blutzellen 0,533; mithin hat im Plasma das freie Cholesterin eine stärkere Zunahme gezeigt, wogegen in den Blutzellen vielmehr das gebundene Cholesterin eine stärkere Zunahme erfuhr. Was aber den Grad der Abschwächung der Hämoglykolyse betrifft, so zeigt sich derselbe beim Falle No. 3 grösser als während der vorigen Woche, in den andern beiden Fällen aber hat er keine merkliche

Verminderung erfahren. Mithin wird die bis zu einem Maximalpunkte hin gestörte glykolytische Kraft bei weiterer Fütterung der Tiere mit Cholesterin, wenn auch der Cholesteringehalt des Blutes hierbei zunimmt, wie es scheint nach Verlauf einer Woche nicht mehr weiter abgeschwächt werden können.

*Erste Woche nach Einstellung der Fütterung mit Cholesterin:*

Die sechs Fälle wurden nach Ablauf einer Woche, nur der Fall 1 erst am achten Tage untersucht; hierbei zeigte ein Fall, der No. 4, zum Unterschiede von den drei anderen, eine Erholung der Hämoglykolyse (um ca. 10–18%) verglichen mit dem Zustande derselben während der vorhergehenden Woche; doch blieb auch in diesem Falle im Vergleich zur Kontrolle noch die glykolytische Kraft um 21,9% zurück; Fall 4 zeigte eine Abnahme um 30,0%, Fall 5 um 29,7%, Fall 6 um 26,9%. Das freie und das gebundene Cholesterin im Blutplasma hat sich dabei auf das 9,0- und 7,1-fache, das 7,6- und 20,5-fache, das 10,3- und 4,1-fache, das 6,6- und 3,7-fache, im Durchschnitt 6,3- und 6,1-mal vermehrt. Das freie und das gebundene Cholesterin der Blutzellen zeigt in den einzelnen Fällen 1,1- und 21,4-fache, 2,2- und 1,6-fache, 1,7- und 5,3-fache, 0,9- und 3,7-fache Vermehrung; die Menge ist mithin im Durchschnitt 1,5- und 3,8-mal gewachsen. Und im Vergleiche zu den für das freie und das gebundene Cholesterin im Plasma im Durchschnitt gefundenen Vermehrungszahlen von 9,6 und 9,9, ist hier jetzt eine Abnahme zu konstatieren; aber bei den Blutzellen ist gegenüber den in der vorhergehenden Woche bei diesen vier Fällen gefundenen Durchschnittszahlen 1,2-mal und 14,4-mal nunmehr eine gewisse Neigung zur Zunahme des freien Cholesterins wahrnehmbar, während hingegen das gebundene Cholesterin ziemlich deutlich abgenommen hat. Wenn man also das Verhältnis zwischen dem Ester und dem Gesamtcholesterin betrachtet, so hatten sich beim Plasma der Wert 0,553, bei den Blutzellen 0,610 gefunden, jetzt aber für das Plasma der Wert 0,557, für die Blutzellen der Wert 0,367; beim Blutplasma ist demnach dieses Verhältnis seit der vorhergehenden Woche fast unverändert geblieben, dagegen bei den Blutzellen erheblich kleiner geworden. Und

der mit der Vorwoche fast die gleiche glykolytische Kraft aufweisende Fall No. 4 zeigt eine deutliche Abnahme des gebundenen Cholesterins in den Blutzellen, sodass es hier nur noch das 1,6-fache des Kontrollversuches beträgt; aber an absoluter Menge übertrifft dieser Fall die anderen Fälle No. 5 u. 6; und betreffs des Falles No. 4 ist unter allen untersuchten, in Anbetracht des Umstandes, dass während der zweiten Woche, wobei der Cholesterin-Ester in den Blutzellen nur eine 1,3-fache Vermehrung im Verhältnis zur Kontrollzeit erreichen konnte, schon eine Abschwächung der Glykolyse eingetreten war, mehr als in den übrigen Fällen, eine Verspätung der Erholung der glykolytischen Kraft doch wohl festzustellen.

*Zweite Woche nach der Einstellung der Cholesterinfütterung:* Bis auf den 2. Fall, bei dem diese Prüfung erst am 17. Tage vorgenommen wurde, zeigt sich, wenn wir die andern fünf Fälle untersuchen, die Glykolyse im Falle 3 noch um 20,0% abgeschwächt, in den andern vier Fällen ist sie hingegen überall auf den Wert der Kontrollzeit zurückgekehrt. Zu dieser Zeit beträgt die Menge des freien und des gebundenen Cholesterins im Blutplasma in den verschiedenen untersuchten Fällen das 3,1- und 3,1-fache, das 4,1- und 3,0-fache, das 7,1- und 5,6-fache, das 6,7- und 1,6-fache, sowie das 4,1- und 2,8-fache; im Durchschnitt ist es 4,8- bzw. 3,0-fach geworden.

Das freie und das gebundene Cholesterin in den Blutzellen hat sich in den einzelnen Fällen in folgender Weise vermehrt: 2,3- und 9,5-fach, 2,0- und 1,7-fach; 0,7- und 0,6-fach, 1,1- und 1,5-fach, 0,9- und 2,5-fach; im Durchschnitt 1,4- bzw. 1,8-fach. Im Plasma ist nun der Gehalt an Cholesterin, insbesondere der an freiem Cholesterin, besonders gross, in den Blutzellen hingegen ist er nur etwas höher als beim Kontrollversuche; aber hier ist noch mehr Ester als freies Cholesterin vorhanden; um also das Verhältnis zwischen dem Ester und dem gesamten Cholesterin beim Plasma vergleichen zu können, hat man (ausgenommen den Fall 1) der sich bei der Kontrolle ergebenden Ziffer 0,630 jetzt die Zahl 0,445 gegenüber zu stellen; bei den Blutzellen verhält sich dies so, dass einer Kontrollzahl 0,203 jetzt die Zahl 0,227 gegenüber steht; und

die Entwicklung des Verhältnisses zwischen dem freien Cholesterin und dem Ester erhält aus der Gegenüberstellung der Kontrollzahl 0,63 mit der neuen Zahl 1,22; bei den Blutzellen sind die entsprechenden Ziffern 3,91 (Kontrolle) und 3,44 (jetziger Wert.)

#### IV. KREUZVERSUCH ZWISCHEN CHOLESTERINBLUT UND NORMALEM BLUT.

Ich habe das Blut, dessen hämoglykolytische Kraft infolge der Fütterung der Tiere mit Cholesterin eine Einbüsse erlitten hatte, mit gesundem Kaninchenblut, dessen hämoglykolytische Kraft ungeschwächt war, vermischt. Von dieser Mischung habe ich vier verschiedene Arten Untersuchungsmaterial hergestellt und sodann die Frage, ob sich in dem Serum sowie in den Blutzellen eine die Glykolyse abschwächende Wirkung einstelle oder nicht, untersucht und das Verhältnis zwischen dem gebundenen und dem freien Cholesterin je nach dem Verlauf eines jeden Falles geprüft.

Die in den Tabellen No. V und No. VI jedesmal den einzelnen Proben vorgesetzten Nummern 1, 2, 3, 4 bezeichnen die einzelnen Klassen des oben angedeuteten verschiedenen Untersuchungsmaterials. Es sind dies nämlich:

- 1) Cholesterinblut,
- 2) Blut von gesunden Kaninchen,
- 3) Cholesterinserum + Blutkörperchen von gesunden Kaninchen,
- 4) Cholesterin — Blutkörperchen + Serum von gesunden Kaninchen.

Cholesterin wurde täglich im Verhältnis von 1 g pro 1 kg Körpergewicht verabfolgt.

Während der ersten Woche trat alsbald eine ganz deutliche Abschwächung der Hämoglykolyse in Erscheinung; doch war vielleicht noch kein Einfluss auf das Serum vorhanden, oder es liess sich höchstens eine ganz unbedeutende Abschwächung in demselben erkennen (Tabelle IX).

In der zweiten Woche, in welche die Zeit eines deutlichen Auftretens der Abschwächung der Glykolyse fällt, tritt beim ersten, dritten und vierten Falle zu gleicher Zeit im Serum und in den

Blutkörperchen eine fast gleichgradige Abschwächung zutage. Beim zweiten und fünften Falle ist allerdings diese Abschwächung im Serum geringer als die gleichzeitig in den Blutkörperchen ersichtliche. In der dritten Woche zeigt sich fast ebenso wie während der vorhergehenden beim dritten Fall die Glykolyse stark abgeschwächt; und beim zweiten Fall zeigt sich der gleiche Grad der Abschwächung beim Serum wie bei den Blutkörperchen; beim Falle No. 1 ist dagegen die im Serum auftretende Abschwächung von geringerem Grade als diejenige in den Blutkörperchen (Tabelle V).

In der ersten Woche nach der Einstellung der Cholesterinfütterung ist beim ersten Falle die am Serum auftretende Glykolyse-Abschwächung plötzlich weggefallen, aber in den Blutkörperchen ist noch eine deutliche Abschwächung wahrnehmbar. Auch in den Fällen No. 2 und No. 5 ist bei den Blutkörperchen noch eine Verringerung der glykolytischen Kraft vorhanden, im Serum jedoch nur noch eine Abschwächung um 6,6% bzw. 3,1%. Man kann also sagen, dass die Abschwächung im Serum bald ein Ende nimmt. Im dritten und vierten Falle ist noch deutlich eine Abschwächung in den Blutkörperchen erkennbar, im Serum hingegen übersteigt dieselbe den Grenzwert physiologischer Schwankungen von 10% nur um höchstens weitere 5% oder sogar nur um 2%. Seit der Einstellung der Cholesterinfütterung nach einer Woche zeigt sich bei allen fünf Fällen in den Blutkörperchen noch deutlich eine Abschwächung der glykolytischen Kraft, aber im Serum hat bei drei Fällen diese Abschwächung bereits aufgehört, und in zwei Fällen ist nur noch eine ganz geringe Abschwächung vorhanden. In der zweiten Woche dann und fernerhin ist die glykolytische Kraft, wie oben gezeigt wurde, in allen Fällen in gleicher Weise zurückgekehrt, und nach kurzer Zeit zeigt sich keinerlei Hemmungserscheinung mehr.

Also tritt im Serum eine Abschwächung der glykolytischen Kraft zutage; aber verglichen mit derjenigen, die sich in den Blutkörperchen zeigt, ist sie im allgemeinen nur geringfügig, und sie hört dann bald auf, in analoger Weise wie in unsrer ersten Mitteilung dargelegt.

TABELLE V.

Nummer der Fälle	Verlauf	Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zucker- abnahme in mg		Absch- wäch- ung der Glykoly- se in %	Eryth- rozyten (mill.)
			Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	zu 100 cem	zu $1 \times 10^5$ mill. Eryth- rozyten		
1.	2. W.	1.	337	184	153	28,3	38,6	5,400
		2.	331	99	232	42,4		5,468
		3.	334	201	133	24,6	42,0	5,400
		4.	438	286	152	27,1	41,2	5,600
	3. W.	1.	602	457	145	32,2	30,1	4,500
		2.	595	306	290	43,1		6,734
		3.	701	507	194	31,2	27,6	6,200
		4.	508	365	143	29,1	36,9	4,912
	1. W. nach der Chole- sterin- aus- setzung	1.	508	294	214	32,9	28,6	6,496
		2.	562	250	312	44,3		7,040
		3.	771	471	300	44,1		6,800
		4.	757	524	233	35,1	23,9	6,640
2.	2. W.	1.	663	509	154	24,8	49,2	6,200
		2.	783	502	281	45,8		6,240
		3.	673	476	197	30,8	31,6	6,304
		4.	595	447	148	24,7	46,7	6,000
	3. W.	1.	425	262	163	27,2	41,3	6,000
		2.	653	319	339	48,0		7,040
		3.	325	155	170	27,2	43,4	6,240
		4.	667	507	160	25,0	46,0	6,400
	8. T. nach der Chole- sterin- aus- setzung	1.	436	254	182	29,2	36,9	6,240
		2.	366	93	273	41,2		6,620
		3.	377	144	233	38,5	6,6	6,044
		4.	364	185	179	28,6	38,2	6,240
3.	2. W.	1.	496	297	199	30,3	31,9	6,560
		2.	693	391	302	44,4		6,800
		3.	609	406	203	32,3	27,3	6,280
		4.	642	442	202	31,5	29,2	6,400

TABELLE V.

Nummer der Fälle	Verlauf	Nummer der Probe	Zuckergehalt		Zucker- abnahme in mg		Absch- wäch- ung der Glykoly- se in %	Eryth- rozyten (mill.)
			Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	zu 100 cem	zu $1 \times 10^5$ mill. Eryth- rozyten		
3.	3. W.	1.	656	462	190	29,1	34,6	6,520
		2.	693	391	302	44,4		6,800
		3.	609	406	203	32,3	27,3	6,280
		4.	642	442	202	31,5	29,2	6,400
	1. W. nach der Chole- sterin- aus- setzung	1.	815	644	171	30,1	22,0	5,688
		2.	652	414	238	40,7		5,800
		3.	649	444	205	34,4	15,5	5,960
		4.	647	497	150	27,7	37,8	5,424
	4.	1.	535	352	183	27,9	35,3	6,558
		2.	649	396	253	40,5		6,240
		3.	692	542	150	24,9	38,5	6,020
		4.	835	664	175	25,7	40,5	6,800
		1. W. nach der Chole- sterin- aus- setzung	1.	777	570	207	32,5	6,400
		2.	764	449	315	45,8		6,800
		3.	608	358	250	40,3	12,0	6,200
		4.	544	300	244	34,9	19,0	6,976
5.	1. W.	1.	366	201	165	26,4	35,9	6,240
		2.	377	135	242	40,2		6,016
		3.	453	261	192	30,0		6,400
		4.	463	294	169	26,9	34,7	6,280
	1. W. nach der Chole- sterin- aus- setzung	1.	436	224	212	33,1	19,7	6,400
		2.	512	212	300	42,6		7,048
		3.	494	236	258	41,3	3,1	6,240
		4.	570	371	199	30,7	25,5	6,488

In den einzelnen experimentellen Fällen geht in gleicher Weise in den Blutkörperchen die Abschwächung der Glykolyse mit der Aufnahme von gebundenem Cholesterin Hand in Hand; im Serum seinerseits wird, indem das freie Cholesterin darin unverkennbar-

zunimmt, eine solche Abschwächung der Glykolyse auch ersichtlich. Eine Beziehung, wie solche zwischen dem Cholesterin-Ester der Blutkörperchen und der Hemmung der Glykolyse besteht, tritt dort nicht zutage. Interessant ist es hierbei, dass die Cholesterin-Blutkörperchen, in dem für die Blutzellen als das geeignetste Medium zu betrachtenden Normalserum aufgeschwemmt, im allgemeinen eine weit erheblichere Abschwächung der glykolytischen Kraft aufweisen, als die Cholesterinblutkörperchen mit ihrem eigenen Cholesterin-Serum, welches natürlich als das Zellenmedium für nicht geeignet gehalten wird. (Es wurden 13 solche Versuche angestellt; dabei wurde achtmal das Auftreten erheblicherer Abschwächung festgestellt, mit Abschwächungsgraden von 2,6% bis zu 15,8%; dreimal wurde eine gleiche Abschwächung bei beiden Proben, 1. und 4., und in zwei Fällen von 4 Proben wurde eine Abschwächung von geringerem Grade, nämlich um 5,0% bis 5,4%, festgestellt.

*Fall der Verabfolgung von täglich nur 0,5 g  
Cholesterin.*

Bei dieser Cholesterinfütterung wurden während der ersten und zweiten Woche keine Untersuchungen vorgenommen. Nachdem dann während der dritten Woche die Abschwächung der Glykolyse deutlich in die Erscheinung trat, wurden nunmehr unter den zur Verfügung stehenden Fällen No. 1, No. 2, No. 4, No. 5 und No. 6 die Beobachtungen begonnen, und es wurde nun festgestellt, dass bei den Fällen No. 2 und No. 5 die Abschwächung der Glykolyse im Blutserum und in den Blutkörperchen gleich gross war, während bei den Fällen No. 4 und No. 6 die im Serum sich einstellende Abschwächung von geringerem Grade war als die, welche in den Blutkörperchen in die Erscheinung trat.

Beim ersten Falle hatte sich am Serum noch keine Abschwächung gezeigt, während dort eine solche in den Blutkörperchen bereits aufgetreten war. In der vierten Woche erschien an den untersuchten Fällen No. 1, No. 2 und No. 3 allgemein die Abschwächung im Serum geringer als die in den Blutkörperchen auftretende; und bei dem zweiten Falle, wo während der dritten Woche

im Serum und in den Blutkörperchen der gleiche Grad von Abschwächung ersichtlich gewesen war, trat nunmehr in der vierten Woche eine Verringerung der Abschwächung in beiden Stoffen gleichmässig zutage.

In der ersten Woche seit der Einstellung der Cholesterinfütterung haben die Fälle No. 1 (erst am 8. Tage untersucht), No. 4, 5 und 6 sämtlich in gleicher Weise im Serum einen geringeren Grad von Abschwächung der glykolytischen Kraft gezeigt als in den Blutkörperchen; dieselbe betrug nämlich im ersteren Falle nur etwa die Hälfte vom Grade der letzteren. Während der zweiten Woche trat unter den geprüften Fällen, No. 2, No. 3 und No. 4, bei No. 3 im Cholesterinblut eine noch geringere Abschwächung, nämlich um nur 20%, zutage; aber hier ist die beim Serum und bei den Blutkörperchen ersichtliche Abschwächung gleich dem Maximum der physiologischen Schwankung. Bei den übrigen beiden Fällen tritt sowohl im Serum als auch in den Blutkörperchen eine Abschwächung der Glykolyse nicht zutage. Mithin ist die Glykolyse des nicht gekreuzten in diesen Versuchen verwendeten Cholesterinblutes zu ihrem Anfangspunkt zurückgekehrt (siehe Tabelle VI).

#### V. DIE BEI KREUZVERSUCHEN VORHANDENEN VERTEILUNGS- VERHAELTNISSE DES CHOLESTERINS IN DEN BLUT- KÖRPERCHEN UND DEM BLUTSERUM.

(Zeitlicher Verlauf der Zucker-Abnahme).

Bei den Versuchen mit einerseits einem Gemisch aus Cholesterinserum und den Blutkörperchen gesunder Kaninchen, anderseits einem solchen aus Cholesterin-Blutkörperchen und dem Serum gesunder Kaninchen, ist es von Interesse zu erfahren, welche Verhältnisse beim Auftreten von Hemmungserscheinungen der Glykolyse im Verteilungsverhältnis des freien und gebundenen Cholesterins in Blutserum sowie auch in den Blutkörperchen obwalten, und anderseits Klarheit über die Frage zu gewinnen, ob ein ganz bestimmtes Verhältnis zwischen diesen Dingen und der Abschwächung der Hämoglykolyse bestehe; da es sich lohnt dies alles zu

TABELLE VI.

Nummer der Fälle	Verlauf	Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zucker- abnahme in mg		Absch- wäch- ung der Glykoly- se in %	Eryth- rozyten (mill.)
			Vor dem Versuch	Nach 24 Std.	zu 100 cem	zu $1 \times 10^6$ mill. Eryth- rozyten		
1.	3. W.	1.	579	393	186	31,8	32,9	5,820
		2.	553	300	253	48,5		5,224
		3.	401	154	247	44,4	8,5	5,568
		4.	516	326	190	35,2	25,7	5,400
	4. W.	1.	535	352	183	32,8	30,8	5,600
		2.	649	396	253	40,5		6,240
		3.	835	660	175	33,7	16,8	5,200
		4.	697	542	155	30,3	36,1	5,120
	8. T.*	1.	406	176	230	37,0	21,9	6,208
		2.	724	309	415	53,0		7,824
		3.	440	187	253	41,1	22,5	6,160
		4.	515	317	198	32,9	30,6	6,018
2.	3. W.	1.	743	588	155	26,4	34,7	5,856
		2.	764	449	315	46,1		6,832
		3.	608	465	143	24,8	46,2	5,768
		4.	544	421	123	21,5	46,8	5,728
	4. W.	1.	716	535	181	31,3	22,5	5,776
		2.	593	328	265	42,5		6,240
		3.	663	514	149	30,5	28,2	4,888
		4.	647	515	132	24,0	40,6	5,496
	8. T.*	1.	512	222	290	44,1		6,584
		2.	444	161	283	44,2		6,400
		3.	480	119	361	47,5		7,600
		4.	435	177	258	41,3		6,240
3.	4. W.	1.	672	533	139	24,1	44,9	5,768
		2.	550	294	256	43,5		5,880
		3.	502	296	206	33,2	23,7	6,200
		4.	566	398	168	29,5	34,3	5,688
	2. W.*	1.	385	162	223	36,0	20,0	6,200
		2.	679	384	295	45,6		6,464
		3.	487	214	273	42,1	7,7	6,480
		4.	380	125	255	40,8	9,1	6,248

\* Nach der Cholesterinaussetzung.

TABELLE VI.

Nummer der Fälle	Verlauf	Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zucker- abnahme in mg		Absch- wäch- ung der Glykoly- se in %	Eryth- rozyten (mill).
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	zu 100 cem	zu $1 \times 10^5$ mill. Eryth- rozyten		
4.	3. W.	1.	737	545	192	30,0	28,6	6,400
		2.	883	599	284	43,2		6,576
		3.	667	466	201	32,2	25,5	6,240
		4.	678	500	178	27,5	34,5	6,120
	1. W.*	1.	679	495	184	28,4	30,0	6,486
		2.	855	570	285	42,3		6,736
		3.	700	479	221	33,1	21,8	6,680
		4.	747	615	142	23,7	43,5	6,000
	17. T.	1.	783	502	281	45,0		6,240
		2.	589	282	307	46,7		6,568
		3.	653	319	334	47,8		7,000
		4.	483	202	281	43,9		6,400
5.	3. W.	1.	736	569	167	26,9	37,6	6,200
		2.	636	320	316	44,9		7,040
		3.	776	570	206	31,4	30,1	6,568
		4.	576	377	199	30,2	29,9	6,568
	1. W.*	1.	644	462	182	30,3	29,7	6,000
		2.	769	499	270	42,2		6,400
		3.	874	664	210	35,9	14,9	5,850
		4.	754	564	190	32,1	25,5	5,920
6.	3. W.	1.	815	644	171	25,2	44,0	6,800
		2.	639	352	287	44,8		6,400
		3.	649	447	207	32,0	28,6	6,240
		4.	647	477	170	27,2	39,6	6,248
	1. W.*	1.	428	228	200	32,9	26,9	6,088
		2.	470	187	283	44,1		6,420
		3.	525	278	247	39,5	10,4	6,240
		4.	321	108	213	35,5	21,1	6,000

\* Nach der Cholesterinaussetzung.

untersuchen, sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen in der Tabelle No. V aufgewiesen.

Es ergibt sich aus dem Obigen, dass, nach dem man das nach Fütterung mit Cholesterin an freiem und gebundenem Cholesterin bereicherte Blutserum mit den an Cholesteringehalt armen Blutzellen von gesunden Kaninchen gemischt hat, sich dann eine Zeitlang in den Blutkörperchen eine Zunahme des Cholesterins, und zwar namentlich eine solche des Cholesterin-Esters, wahrnehmen lässt. Und wenn man dann dieses Präparat 24 Stunden lang im Brutofen aufbewahrt hat und nach Ablauf dieser Zeit abermals prüft, gewinnt man das Ergebnis, dass der Cholesterin-Ester in den Blutkörperchen eine weitere Zunahme erfahren, dagegen das freie Cholesterin in denselben abgenommen hat. Wenn man aber im Gegenteil hierzu die Cholesterin-Blutkörperchen mit dem Blutserum gesunder Kaninchen vermischt, so nimmt der je nach der Grösse der Cholesteringabe angewachsene Gehalt an Blutkörperchen-Cholesterinester gleichzeitig ab. Daher nimmt der Cholesterin-Ester-Gehalt des als Medium benutzten Serums gesunder Kaninchen zwar zu; indessen ist doch diese Veränderung, verglichen mit der vorigen Probe, d.h. Cholesterinserum + gesunde Blutzellen, nur langsam und unbedeutend. Auch wenn man zum Zwecke des Experiments das Blut gesunder Kaninchen 24 Stunden hindurch im Brutofen belassen hat, ist danach kein Unterschied irgend welcher Art zwischen dem Zustande vor und nach dem Aufenthalt im Brutofen wahrzunehmen; und dementsprechend liegt der Grund der bei Zumischung von Blutzellen gesunder Kaninchen zum Cholesterin-Serum in Erscheinung tretenden Abschwächung der Hämoglykolyse nicht im Serum selbst, sondern vielmehr darin, dass im Cholesterinserum vorhandenes Cholesterin, insbesondere in der Form von Cholesterinester, in die Blutzellen der gesunden Kaninchen eindringt und daselbst Störungen hervorruft, welche als sekundär störende Wirkungen betrachtet werden können.

Nun habe ich an den bei den Kreuzversuchen angegebenen vier verschiedenen Arten von Versuchsmaterial den Zuckergehalt im Vollblut und im Serum gemessen (indem ich die Masse je einer der genannten Arten in zwei gleich grosse Portionen teilte und

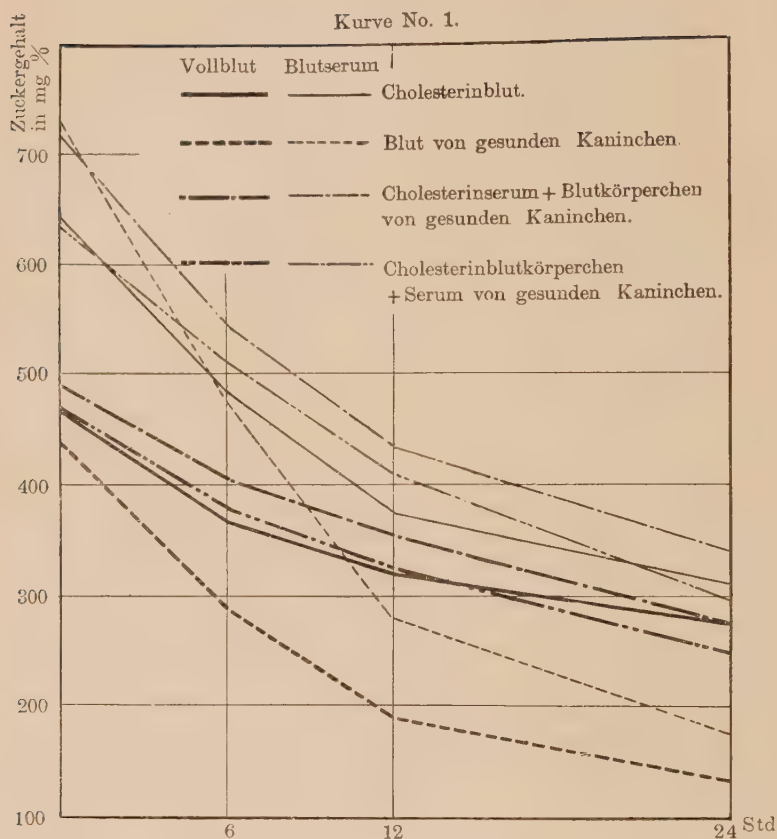
G = Gesamtholesterin  
F = Freies Cholesterin  
E = Cholesterinester

TABELLE VII.

Arten des Blutes		Cholesteringehalt in mg %								
		Vollblut			Blutserum			Blutkörperchen		
		G.	F.	E.	G.	F.	E.	G.	F.	E.
Blut von gesunden Kaninchen		134	84	50	103	31	72	171	150	21
Cholesterinblut		856	305	551	1063	438	625	616	129	487
Cholesterinserum + Blutkörperchen von gesunden Kaninchen	Vor dem Versuch	750	331	419	1063	438	625	388	207	181
	Nach 24 Stdn.	750	313	437	1031	438	593	425	168	257
Cholesterinblutkörperchen + Serum von gesunden Kaninchen	Vor dem Versuch	200	94	103	188	75	113	225	132	93
	Nach 24 Stdn.	200	94	106	200	75	125	200	132	68
Blut von gesunden Kaninchen	Vor dem Versuch	115	83	32	97	46	48	140	129	11
	Nach 24 Stdn.	115	83	32	97	46	48	140	129	11

TABELLE VIII.

Arten des Blutes	Zuckergehalt in mg %	Zuckerabnahme in mg			Glykolytische Kraft in mg			Erythrozyten (mill.)			
		Vor dem Versuch	Nach 6 Stdn.	Nach 12 Stdn.	Nach 24 Stdn.	Nach 6 Stdn.	Nach 12 Stdn.		Nach 24 Stdn.		
Cholesterinblut	Vollbut	457	367	322	278	100	145	189	23,2	30,0	6,240
	Blutserum	643	486	372	312	157	271	331	24,7	43,7	53,0
	Blutkörperchen	203	188	248	220						
Blut von gesunden Kaninchen	Vollbut	437	290	193	137	147	244	300	22,1	36,7	45,2
	Blutserum	728	473	281	177	255	447	551	38,4	38,4	83,0
	Blutkörperchen	82	67	84	89						
Cholesterinserum + Blutkörperchen von gesunden Kaninchen	Vollbut	491	406	355	275	85	136	216	14,2	22,7	36,0
	Blutserum	716	546	436	338	170	280	378	28,3	46,7	63,0
	Blutkörperchen	215	236	256	124						
Cholesterinblutkörperchen + Serum von gesunden Kaninchen	Vollbut	470	380	324	251	90	146	219	14,8	24,0	36,0
	Blutserum	684	509	412	298	175	272	386	28,8	44,6	63,5
	Blutkörperchen	209	222	216	193						



dann den einen dieser Teile so, wie er war, als Vollblut untersuchte, von der andern Hälfte in der Zentrifuge das Blutserum trennte, und diesbezüglich den jeweiligen Zuckergehalt bestimmte); daraus wurde der Zuckergehalt in den Blutkörperchen festgestellt, indem das Volumenverhältnis zwischen dem Serum und den Blutzellen bei jeder Art Material in Rechnung gezogen wurde. (Da der in der geringen Menge Serum, die an den Blutkörperchen noch vorhanden war, vorhandene Zuckergehalt nicht bestimmt werden konnte, so ergaben sich keine ganz genauen Zahlen; man muss sich mit einer ungefähren Bestimmung begnügen; doch hat wohl diese verhältnismässige Ungenauigkeit wenig zu bedeuten, da die

Ergebnisse aus den gleichbedingten Untersuchungen herrühren).

Die diesbezüglichen Prüfungen wurden in Zeitabständen von 6, 12 und 24 Stunden vorgenommen.

Wie sowohl Tabelle VIII als die Kurve No. 1 zeigen, ist die absolute Menge der Zuckerabnahme bei gesundem Kaninchenblut am grössten, bei den andern drei untersuchten Blutarten geringer; aber vom Standpunkte des zeitlichen Verlaufs aus betrachtet zeigen diese vier untersuchten Blutarten fast den gleichen Kurvenverlauf: von den anfänglichen 6 Stunden bis zum Ablauf von zwölf Stunden ist die Abnahme des Zuckers deutlich; dass dieselbe danach geringer wird, verhält sich analog dem in unsrer ersten Mitteilung Dargelegten. Insbesondere in den anfänglichen sechs Stunden ist die Abnahme des Zuckers im Serum grösser als die im Vollblut. Man kann sich aus diesem Grunde denken, dass zu Anfang während des Verlaufs mehrerer Stunden die Zuckermoleküle des Serums sehr rasch in die Blutkörperchen eindringen; die Frage, ob dabei, auch ohne dass diese Zuckermoleküle wirklich in die Blutkörperchen eindringen, die ersteren von den letzteren lediglich absorbiert werden, will ich mir, als nicht unmittelbar in den Rahmen dieser Arbeit gehörend, eingehends zu erörtern versagen; aber es ist kurz gesagt klar, dass die im Serum enthaltenen Zuckermoleküle in die Blutkörperchen aufgenommen werden. Interessant ist es dabei, dass, verglichen mit der in den Blutkörperchen gesunden Blutes enthaltenen Zuckermenge, die in den drei andern Blutarten in deren Blutkörperchen enthaltenen Zuckermengen ausserordentlich beträchtlich sind; mithin spalten sich die im normalen Blute vorhandenen Zuckermoleküle bei ihrem Eintritt in die Blutkörperchen alsbald; wenn aber auch im Cholesterinblute die Zuckermoleküle in die Blutkörperchen eintreten oder von diesen absorbiert werden, so zeigt sich die Erscheinung, dass diese Zuckermoleküle alsdann durch ihre Funktion eine Spaltung erfahren, doch nur in ganz geringem Masse.

#### *Versuch mittels Injektion von Vitamin B.*

Wie ich in meiner dritten Mitteilung darlegen werde, wird das Blut von mit poliertem Reis ernährten Kaninchen in gewisser

Hinsicht mit den Zuständen der in dieser Mitteilung experimentell untersuchten mit Cholesterin gefütterten Kaninchen, betreffs des Vorhandenseins freien und gebundenen Cholesterins in deren Blute, betreffs der Verringerung der glykolytischen Kraft und betreffs des Anstieges des Zuckergehaltes im Blute, zu vergleichen sein; doch das Verhältnis dieser Erscheinungen ist nicht gleichmässig. In diesem Zusammenhange vermute ich, dass auch Vitamin B gegen die Abschwächung der Glykolyse im Cholesterinblute keinen günstigen Einfluss ausüben wird. Trotzdem wir nämlich solchen Kaninchen, deren Blut infolge der Fütterung, mit Cholesterin seine glykolytische Kraft zum Teil eingebüsst hatte, täglich je 10 ccm einer 2%igen Beriberol-Lösung eine Woche lang injizierten, wurde in deren Blute dessen glykolytische Kraft nicht im geringsten hergestellt (siehe Tabelle No. IX).

TABELLE IX.

Datum	Zucker- gehalt in mg %		Zucker- abnahme in mg		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (mill.)	Nummer der Probe Kreuzversuch	Bemerkungen
	Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	zu 100 ccm	zu $1 \times 10^5$ mill. Eryth- rozyten				
26. VII.	470	187	283	44,5		6,360		Wert in der gesunden Zeit am 7. Tage nach Cholesterin- fütterung.
1. VIII.	404	188	216	37,5	16,1	5,760	1.	
	517	232	285	46,8		6,096	2.	
	373	83	290	47,1		6,160	3.	
	366	121	245	39,8	10,3	6,160	4.	am 14. Tage nach Cholesterin- fütterung.
8. VIII.	467	278	189	30,0	32,6	6,240	1.	
	437	137	300	45,2		6,640	2.	
	491	275	216	36,0	20,4	6,000	3.	
	470	251	219	36,0	19,0	6,080	4.	
15. VIII.	527	344	183	30,5	31,5	6,000		Seit 8. VIII. Beriberol-Inj.

Fall 2.

26. VIII.	636	320	316	44,9		7,040		Wert in der gesunden Zeit.
4. VIII.	483	302	181	30,2	32,7	6,000	1.	am 7. Tage nach Cholesterin-
	421	152	269	43,1		6,240	2.	fütterung.
	416	156	260	40,6	5,8	6,400	3.	
	454	234	220	34,4	23,4	6,400	4.	
11. VIII.	340	152	188	30,1	33,0	6,240		am 14. Tage nach Cholesterin-
								fütterung.
18. VIII.	572	395	177	29,5	34,3	6,160		Seit 11. VII. Beriberol-Inj.

VI. DAS KÖRPERGEWICHT DER MIT CHOLESTERIN GEFUETTERTEN  
KANINCHEN, UND DER IN NUCHETERNEM ZUSTANDE  
GEFUNDENE BLUTZUCKER.

Wenn man Kaninchen auf je 1 kg Körpergewicht 1 g Cholesterin verabfolgte, und fünf Fälle einzeln beobachtete, so ergab sich das folgende Resultat:

Während der ersten Woche zeigt eine Abnahme des Körpergewichtes im Verhältnis zum Kontrollversuch nur der Fall No. 4 (nämlich um 7,1%). Die übrigen vier Fälle weisen hingegen eine, wenn auch ganz unerhebliche, Zunahme auf. (Sie beläuft sich auf 0,7–1,1%, im Durchschnitt auf 0,9%).

Während der zweiten Woche weist nur das Beispiel No. 4 eine Abnahme (nämlich um 8,7%) auf; die andern vier Fälle hingegen nehmen um bzw. 1,5%, 6,1%, 1,8% und 4,1%, im Durchschnitt um 4,4% zu.

In der dritten Woche zeigt nur der Fall No. 1 eine geringe Abnahme (um 1,1%); die anderen zwei Fälle aber, No. 2 und 3, erfahren Zunahmen um 15,1% bzw. 1,8%, im Durchschnitt um 8,5%.

In der ersten Woche seit der Einstellung der Cholesteringaben zeigt sich in allen fünf Fällen eine Zunahme, nämlich um bzw. 3,7%, 19,5%, 1,6%, 4,8% und 4,5%; im Durchschnitt eine solche um 4,8%.

In der zweiten Woche nach Einstellung der Cholesterinfütterung betrug die Zunahme bei den einzelnen Fällen bzw. 3,0%, 5,4%, 1,4%, 0,8%, 2,6%; der Durchschnitt betrug 2,7%. Infolge

der Fütterung mit Cholesterin nimmt also das Körpergewicht, wenn auch nicht in hohem Grade, im allgemeinen zu; nach der Einstellung der Cholesteringaben findet dann eine geringe Abnahme des Gewichts statt, doch ist das Gewicht dabei noch grösser als das in der Kontrollzeit.

*Wenn man täglich nur 0,5 g Cholesterin verabfolgt, so erhält man die folgenden Ergebnisse:*

Während der ersten Woche nach der Verabfolgung der obigen Cholesteringabe zeigten unter sechs Experimentfällen zwei, nämlich Fall 2 und Fall 3, eine Abnahme des Körpergewichts, um 1,7% bzw. 0,8%; die andern vier Fälle hingegen wiesen Zunahmen auf, nämlich um 0,4%, 0,8%, 0,8%, 2,9%, im Durchschnitt um 1,2%.

In der zweiten Woche zeigt nur noch der Fall 1 eine Abnahme, nämlich um 0,4%; alle übrigen Fälle erfuhren Zunahmen, nämlich um bzw. 0,3%, 0,5%, 7,1%, 4,2% und 4,0%; der Durchschnitt der Zunahme betrug 4,2%.

In der dritten Woche zeigte sich, dass bei dem Falle No. 3 das Gewicht, und zwar um 4,0%, abgenommen hatte; die andern Fälle wiesen aber der Reihe nach mit 2,4%, 1,0%, 10,2%, 7,8% und 6,2%, im Durchschnitt 5,5%, sämtlich Zunahmen auf.

In der vierten Woche zeigte unter drei beobachteten Fällen der zweite Fall eine Abnahme um 0,4%, die beiden andern Fälle hingegen Zunahmen um 2,0% und 3,2%, im Durchschnitt 2,6%.

In der ersten Woche seit der Einstellung der Cholesteringaben zeigen alle beobachteten Fälle Zunahmen, nämlich um 1,2%, 6,0%, 6,6%; 2,7%; im Durchschnitt betrug die Zunahme 4,2%.

Während der zweiten Woche nach Einstellung der Cholesterinfütterung nimmt das Gewicht bei allen Fällen zu um bzw. 0,1%, 4,8%, 6,0%, 4,7% und 4,8%, was einer durchschnittlichen Zunahme von 4,2% gleichkommt. Also auch bei der Verabfolgung kleiner Dosen Cholesterin stellt sich eine zwar geringfügige, aber allgemeine Zunahme des Körpergewichts ein; und auch noch nach der Einstellung der Cholesterin-Zufuhr findet noch 14 Tage lang eine Zunahme gegenüber den Kontrollversuchen statt, welche von der während der Fütterung mit Cholesterin eingetretenen quantitativ nicht sehr verschieden ist.

*Blutzucker:*

Bei der Verabfolgung von je 1 g Cholesterin pro 1 kg Körpergewicht zeigt sich, wie in der Tabelle No. X gezeigt ist, beim Falle No. 1 während der ersten Woche gegenüber dem Kontrollversuch ein Absteigen des Blutzuckers, bei den andern Fällen hingegen überall eine Zunahme desselben.

Wenn man täglich nur 0,5 g Cholesterin verabfolgt, so haben, wie in der Tabelle No. III aufgeführt ist, während der ersten Woche zwei Fälle, nämlich der erste und fünfte Fall, ein Ansteigen der Blutzuckermenge, die andern vier Fälle aber eine Verringerung derselben gezeigt.

Während der zweiten Woche weisen wieder zwei Fälle ein Ansteigen, vier Fälle eine Abnahme, in der dritten Woche drei Fälle, nämlich der erste, dritte und fünfte Fall, eine Zunahme, die übrigen drei Fälle hingegen sämtlich ein Absteigen auf.

Nach der Einstellung der Cholesterinfütterung zeigen drei Fälle ein Aufsteigen, drei andere aber eine Abnahme des Blutzuckers.

Hieraus erhellt, dass bei der Verabfolgung kleiner Dosen von Cholesterin, so lange diese Verabfolgung auch fortgesetzt wird, die Fällen einer dadurch entstehenden Zunahme des Blutzuckers wenig zahlreich sind.

VII. ZUSAMMENFASSENDE BEMERKUNGEN.

Nach den Ergebnissen der oben beschriebenen Untersuchungen ist bei der Fütterung von Kaninchen mit Cholesterin je nach der Dosierung wohl eine gewisse Differenz der Zeit des Auftretens einer Abschwächung der glykolytischen Kraft des Blutes der Tiere vorhanden; aber von einer bis zu zwei Wochen nach der Verfütterung an tritt diese Abschwächung allgemein zuerst im Blute zutage und erreicht während der zweiten oder dritten Woche ihren höchsten Grad. Um diese Zeit nimmt das gebundene sowohl als das freie Cholesterin im Blute gleichzeitig zu; aber in den Blutkörperchen zeigt dabei der Cholesterin-Ester eine besonders hohe Zunahme, wogegen im Serum das freie Cholesterin einigermassen zunimmt. Mithin ist das Verhältnis des Cholesterin-Esters zu dem Gesamt-

TABELLE X.

Blutzucker						Körpergewicht						
Nummer der Fälle	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Verlauf												
Kontrolle	86	95	95	72	92		2,700	2,780	2,790	2,500	2,680	
1. W.	113	103	107	103	115		2,730	2,800	2,820	2,340	2,700	1 g Cholesterin pro kg Körper- gewicht gegeben.
2. W.	79	149	116	114	114		2,740	2,950	2,840	2,300	2,790	
3. W.	116	137	100				2,680	3,200	2,840			
1. W.*	112	108	103	75	84		6,720	3,320	2,835	2,400	2,800	
2. W.	104	93	101	95	106		2,780	2,930	2,820	2,500	2,750	
Kontrolle	100	86	92	110	72	114	2,520	3,000	2,480	2,660	2,580	2,720
1. W.	110	81	86	87	97	113	2,530	2,950	2,500	2,640	2,600	2,800
2. W.	106	76	82	97	109	90	2,510	3,010	2,640	2,850	2,690	2,830
3. W.	134	75	99	92	91	103	2,580	3,030	2,380	2,870	2,780	2,890
4. W.	114	115	134				2,570	2,980	2,560			
1. W.*	75	108		91	82	100	2,550	3,020		2,820	2,750	2,800
2. W.			70	114	104	78				2,800	2,700	2,850

\* Nach Cholesterinaussetzung.

Cholesterin, verglichen mit den Ergebnissen der Kontrollbeobachtungen, bei den Blutkörperchen sehr gross, aber im Blutplasma demgegenüber ziemlich gering; und wenn wir den Verlauf bei den oben beschriebenen Fällen verfolgen, so beträgt die Menge des Cholesterin-Esters in den Blutkörperchen, im Verhältnis zu der der Kontrolle, durchschnittlich das Fünffache. Wenn nun das Verhältnis zwischen dem Cholesterin-Ester und dem Gesamt-Cholesterin im Durchschnitt das Zweifache bis 2,5-fache ausmacht im Vergleich mit dem zur Kontrollzeit (0,18), so tritt hinfort eine Abschwächung der Glykolyse in Erscheinung; und mit der Zunahme der Quantität erfährt dann auch der Grad der Abschwächung eine Verstärkung. Nachdem die Verabfolgung der Cholesteringaben eingestellt wurde, nimmt der Gehalt an Cholesterin-Ester in den Blutkörperchen relativ rasch ab; das Verhältnis zwischen dem Cholesterin-Ester und dem Gesamt-Cholesterin wird nun mit dem des Kontrollversuches gleich, und die glykolytische Kraft des Blutes kehrt zu ihrem Normalwert zurück. Aber während dieser Zeit ist die absolute Menge im Verhältnis zur Kontrolle durchschnittlich etwa auf das Doppelte gewachsen. Wie nämlich aus den Kurven No. 2 und No. 3 ersehen werden kann, zeigt die Gehaltmenge an Cholesterin-Ester in den Blutkörperchen mit dem Grade der Abschwächung der glykolytischen Kraft des Blutes fast einen parallelen Verlauf. Natürlich vermag zwischen der Mengen-Zunahme des freien Cholesterins hierbei und der Abschwächung, welche die Glykolyse erfährt, ein bestimmtes Verhältnis nicht unbedingt in Abrede gestellt werden; jedoch lässt sich nicht absolut klar darlegen, dass zwischen der Glykolyse-Abschwächung einer- und der Zunahme des freien Cholesterins anderseits ein Kausalnexus mit dem dosalen Verhältnis des freien Cholesterins in der Form von Cholesterin-Ester angenommen werden kann. Was den gleichzeitig sich abspielenden Vorgang der Abschwächung der Glykolyse betrifft, so erleidet je nach dem Umfange der Cholesteringaben der Colloidzustand des Serums sowie auch der Blutkörperchen eine mehr oder weniger grosse Veränderung. Einem Eindringen der Zuckermoleküle in die Blutkörperchen wird ein sehr hoher Widerstand entgegengesetzt; und die Blutzellen würden ja auf die Zuckermoleküle

eine glykolytische Wirkung ausüben; da nun aber die Zuckermoleküle in die Blutzellen nicht einzudringen vermögen, so sind diese nicht in der Lage ihre glykolytische Kraft an den Zuckermolekülen auszuüben; man kann aber auf Grund dieser einfachen mechanischen Bedingungen die vorliegenden Tatsachen nicht erklären. Aus den Ergebnissen des dritten und vierten Kreuzversuches erhellt, wie gezeigt, dass unter diesen Bedingungen der Zucker in noch höherem Grade vom Blutserum resorbiert worden ist, als dies in normalen Blutkörperchen geschieht. Wenn man nun noch die Cholesterin-Blutkörperchen dem Normal-Serum beimischt, so weist der dadurch geschaffene Zustand eine höhere die Glykolyse abschwächende Kraft auf, als derjenige der Beimischung von Cholesterinzellen in Cholesterinserum. Und auch wenn man in Cholesterin-Serum normale Blutzellen einmischt, wird ebenso wie im Cholesterinblut die Glykolyse abgeschwächt. Mithin wird bei der Einführung von Cholesterinblut-Zellen in Normalserum die Abschwächung der Glykolyse wieder besonders stark; eine Neigung zur Erholung der glykolytischen Kraft erweist sich also *nicht*. Aber zu der Zeit, wo die Verabfolgung der Cholesteringaben eingestellt wird, ist die absolute Menge des Cholesterins noch ziemlich hoch; und trotzdem nun in dem colloidalen Zustande des Blutes eine Änderung offenbar zutage liegt, kehrt das Verhältnis zwischen dem Cholesterin-Ester und dem Gesamt-Cholesterin jetzt gleichzeitig mit der Wiederherstellung der glykolytischen Kraft zur Erholung zurück. Auf dieser Tatsache fussend kann man wohl behaupten, die Abschwächung der glykolytischen Kraft sei eine auf einer Änderung des Colloidzustandes der Blutkörperchen beruhende Funktionsstörung in diesen Körperchen; aber es lässt sich dies nicht allein als einen solchen rein mechanischen Vorgang, eine Diffusionsstörung von Zuckermolekülen in die Blutkörperchen, erklären. Auf Grund der verschiedenen oben beschriebenen experimentellen Untersuchungen habe ich die Erscheinung, dass die glykolytische Kraft des Blutes von mit Cholesterin gefütterten Kaninchen eine Abschwächung erleidet, unter anderm auf die Zunahme der im Blut enthaltenen Cholesterin-Mengen, also darauf, dass das Verhältnis zwischen dem Cholesterin-Ester und dem Gesamt-Cholesterin in

den Blutkörperchen grösser wurde, und hierdurch die Funktion derselben eine Störung erleidet, als Grundursache zurückgeführt.

### VIII. SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Wenn man Kaninchen mit Cholesterin füttert, so wird die glykolytische Kraft des Blutes derselben von der ersten Woche an abgeschwächt; während der zweiten oder dritten Woche erreicht dann diese Abschwächung ihren Höchstbetrag. Nach erfolgter Einstellung der Verabfolgung von Cholesterin wird auch noch während der ersten Woche eine gewisse Abschwächung beobachtet. In der zweiten Woche macht dieselbe aber wieder dem Werte des Kontrollversuches Platz. Diese Tatsache stimmt im grossen und ganzen mit dem in der ersten Mitteilung Gesagten überein. Wenn aber die Menge des verabfolgten Cholesterins gering, nämlich nur täglich 0,5 g, ist, so wird während der ersten Woche die Glykolyse noch nicht abgeschwächt; die Abschwächung setzt vielmehr erst während der zweiten Woche ein.

2. Wenn man Kaninchen Cholesterin verabfolgt, so nimmt die Menge des freien und des gebundenen Cholesterins in den Blutkörperchen sowie im Blutplasma allmählich zu; aber dabei zeigt das freie Cholesterin eine besonders erhebliche Zunahme im Blutplasma, während sich das gebundene Cholesterin in erster Linie in den Blutkörperchen vermehrt. Daher ist denn das Verhältnis des gebundenen zum Gesamt-Cholesterin in den Blutkörperchen erheblich, im Blutplasma gering. Wird Cholesterin daher nur in kleinen Dosen verabreicht, so wird noch mehr als bei Verabreichung grösserer Gaben diese Mengenzunahme des Cholesterins, sowie die erwähnte Wandlung des Verhältnisses des in den Blutkörperchen bzw. im Blutplasma vorhandenen freien und gebundenen Cholesterins eine Verspätung erleiden.

3. Das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen wird bei einer Zunahme bis zu einem gewissen Grade, d. h. wenn nämlich dessen absolute Menge durchschnittlich das Fünffache der Kontrolle erreicht, — wobei das Verhältnis des gebundenen zum Gesamtcholesterin durchschnittlich wie 2:1 oder 2,5:1 ist (in der Kontrolle wird diese Verhältniszahl in den Blutkörperchen zu durchschnitt-

lich 0,18 angegeben) — die Wirkung haben, dass die glykolytische Kraft des Blutes eine Abschwächung zu erleiden beginnt. Indem der Cholesterin-Ester allmählich vermehrt wird, wird gleichzeitig damit auch der Grad der Abschwächung der glykolytischen Kraft zunehmen. Bei Einstellung der Cholesterinfütterung nimmt der Gehalt an gebundenem Cholesterin in den Blutkörperchen relativ rasch ab, und das Verhältnis zwischen dem gebundenen und dem Gesamt-Cholesterin kehrt zugleich mit Wiederkehr des früheren Verhältnisses der glykolytischen Kraft in Übereinstimmung mit der Kontrolle wieder zur Norm zurück. Aber zu der Zeit, da dies geschieht, beträgt die absolute Menge des Cholesterins noch durchschnittlich das Doppelte der bei der Kontrolle vorgefundenen Menge. Bei der Fütterung mit Cholesterin kann man einen gewissen Zusammenhang zwischen der Abschwächung der Glykolyse im Kaninchenblut und der Menge des gebundenen Cholesterins in den Blutkörperchen erkennen; aber zwischen dem freien und dem gebundenen Cholesterin im Blutplasma oder dem Vermehrungsgrade des Verhältnisses des gebundenen zum Gesamtcholesterin einerseits und andererseits der Abschwächung, welche die glykolytische Kraft erleidet, lässt sich ein ganz bestimmter Zusammenhang nicht darlegen.

4. Von dem Cholesterinblut, dessen glykolytische Kraft eine besonders augenfällige Abschwächung erlitten hatte, wurde das Serum abgetrennt; wenn man dasselbe mit den Blutkörperchen gesunder Kaninchen mischt, dann wird die glykolytische Kraft derselben alsbald fast ebenso stark wie die der Cholesterin-Blutkörperchen gestört, und zu dieser Zeit nimmt das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen deutlich erkennbar zu.

5. Die Abschwächung der Glykolyse von Cholesterinblut tritt in den Blutkörperchen im allgemeinen noch früher und stärker als im Blutserum zutage. Im Gegensatze dazu zeigt sich jedoch die Erholung der glykolytischen Kraft zuerst im Serum, in den Blutkörperchen hingegen erst später, in Übereinstimmung mit dem in der ersten Mitteilung bereits Festgestellten.

6. Die bei Cholesterinfütterung auftretende Änderung des Körpergewichts, sowie die während der Nüchternzeit auftretenden

Veränderungen im Blutzucker stimmen auch mit dem in unserer ersten Mitteilung Gesagten überein; im allgemeinen nehmen diese beiden nämlich etwas zu; aber nur in einer geringeren Zahl der Fälle von Verabreichung geringerer Dosen von Cholesterin ist die Zunahme des Blutzuckers zu erkennen, verglichen mit derjenigen bei grösseren Cholesteringaben.

7. Die durch Cholesterinfütterung abgeschwächte glykolytische Kraft zeigt trotz der Verabfolgung von Vitamin-B doch keine Erholung.

#### LITERATUR.

- Izawa, M. (1925): Nippon Biseibutsugakkai Zassi, **19**, 1363.  
Kawashima, Y. u. Chiwaki, J. (1931): Journ. of Biochem., **13**, 107.  
Knudson (1921): Journ. of Biol. Chem., **45**, 255.  
Sudo, K. (1931): Medizinisch-chemische Mikrobestimmungsmethoden, I. Aufl. (Japanisch).  
Szent-Györgyi (1922): Biochem. Zeitschr., **136**, 107.  
Wacker u. Hück (1913): Münch. med. Wochenschr., **38**, 2097.



# ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER HÄMOGLYKOLYSE DURCH DIE NAHRUNG, MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER AVITA- MINOTISCHEN DIÄT.

## III. Mitteilung.

### Die Hämoglykolyse der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen.

VON

JINJI CHIWAKI.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Akademie der Nihon-Daigaku,  
Tokyo. Vorstand: Prof. Dr. Z. Hattā.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1932)

## I. EINLEITUNG.

Die Reiskrankheit oder B-Avitaminose ist eine Stoffwechselkrankheit, bei welcher eine Kohlehydrat-Stoffwechselstörung die Hauptrolle spielt. Über die Steigerung der Blutzuckerkurve dabei, sowie die Abnahme des Grundumsatzes sowohl als der Atmung der Organzellen ist durch die Untersuchungen zahlreicher Forscher bereits Klarheit gewonnen worden. Takemoto (1927) hat durch seine genauen Untersuchungen der Hämoglykolyse bei der Reiskrankheit der Hühner die dabei eintretende Abschwächung der Glykolyse erwiesen. Auch ich habe bei der Fütterung von Kaninchen mit poliertem Reis betreffs der Frage, ob hierbei die Glykolyse eine Hemmung erfährt sowohl (indem es nämlich von Interesse ist zu erfahren, ob zwischen kernhaltigen und kernlosen Erythrozyten bezüglich dieser Glykose ein Unterschied obwaltet), als betreffs der Frage des Zusammenhanges zwischen der Ernährung und der Glykolyse Untersuchungen vorgenommen und früher mit Prof. Kawashima (an Kaninchen Cholesterin und Lecithin verabfolgend und an denselben die Verhältnisse der Glykolyse beobachtend) über unsere gemeinsame erste Arbeit berichtet (1931). Bei der Fütterung mit Cholesterin findet gleichzeitig mit einer Zunahme

des Gesamt-Cholesterins im Kaninchenblute von der ersten Woche ab eine Abschwächung der Hämoglykolyse statt; nach Einstellung der Cholesterinverabreichung sinkt der Cholesteringehalt des Blutes allmählich wieder ab, und die Hämoglykolyse kehrt gleichzeitig auch zu ihrem Normalwert zurück. Dass bei der Verabfolgung von Lecithin die Glykolyse keineswegs eine Hemmung erfährt, haben wir bereits in unserer ersten Mitteilung dargelegt. Danach habe ich in meiner zweiten Mitteilung bekannt gegeben, dass wenn infolge von Cholesterinfütterung die Hämoglykolyse gehemmt wird, in den Blutzellen der Cholesterinester eine Zunahme erfährt, und dass nach Einstellung der Cholesterinfütterung die Glykolyse sich erholt und der im Blut enthaltene Cholesterinester deutlich abnimmt; auch habe ich dargelegt, dass das Verhältnis zwischen dem gebundenen und dem freien Cholesterin in den Blutzellen zu seinem normalen Werte zurückkehrt. Ferner haben Asada (1922, Ozawa 1924, Kodama 1925 und Lawaczek 1923), experimentell nachgewiesen, dass bei der Reiskrankheit nicht nur bei Vögeln, sondern auch bei Kaninchen, Hunden usw. das Blutcholesterin zunimmt. Ich habe nunmehr Kaninchen, welche kernlose Erythrozyten haben, mit poliertem Reis gefüttert, und über deren Hämoglykolyse, das freie und gebundene Cholesterin ihres Blutes, und besonders über die Frage der Verteilung des Cholesterins auf die Blutzellen und das Blutplasmas Untersuchungen angestellt und dadurch den Mechanismus der Abschwächung, den die Glykolyse erfährt, zu erkennen versucht; ausserdem habe ich den mit poliertem Reis ernährten Kaninchen einige Hormone und andere Körper injiziert und Beobachtungen darüber angestellt, welchen Einfluss dieselben auf die Abschwächung der Hämoglykolyse ausüben. Betreffs der bei Avitaminose und bei der Reiskrankheit auftretenden Stoffwechselstörungen sind nun viele Gelehrte der Meinung, dass diese die Folge von Hunger seien; nur Go (1929) hat, indem er an Ratten Untersuchungen vornahm, festgestellt, dass infolge von Hunger zwar eine Abnahme des Respirationsquotienten und Gaswechsels eintritt, zugleich aber bewiesen, dass eine solche Abnahme insbesondere bei B-Avitaminose in die Erscheinung tritt. Ausserdem wurde aber auch durch

Nakae (1930) und andere Forscher darauf hingewiesen, dass eine Körpergewichtsabnahme und ein Sinken der Temperatur des Körpers ja nicht nur bei Hunger und bei Avitaminose vorkommt, und dass ausserdem bei Kaninchen als Folgeerscheinung des Hungers auch eine Zunahme des Cholesteringehaltes des Blutes auftrete. Wenn man Kaninchen mit poliertem Reis ernährt, so tritt allerdings allmählich Appetitmangel ein, in dessen Folge tatsächlich ein relativer Hungerzustand platzgreift; daher habe ich denn auch zur Kontrolle den Zustand der Hämoglykolyse bei Kaninchen untersucht, welche dem absoluten Hungerzustand ausgesetzt waren.

## II. DIE HAEMOGLYKOLYSE IN DEM HUNGERN DEN KANINCHEN.

### *Untersuchungsmethode.*

Zum Zweck der Kontrolle habe ich bei gesunden Kaninchen die Hämoglykolyse, die Blutzuckermenge im nüchternen Zustande, sowie das Körpergewicht durch Wägung festgestellt; dann habe ich, während ich den Kaninchen keinerlei Nahrung zuführte und sie nur Wasser saufen liess, ihnen je fünf Tage bzw. eine Woche hindurch Blut entnommen, die oben genannten Punkte untersucht und mit den entsprechenden in der gesunden Zeit verglichen. Die Bestimmungsmethoden der glykolytischen Kraft und der Blutzuckermengen waren genau die gleichen, wie sie in der ersten und zweiten Mitteilung angewendet wurden.

### *Untersuchungsergebnisse.*

An sechs Fällen wurde die glykolytische Kraft bei Hunger mit dem allerniedrigsten der bei der Kontrolle gefundenen Werte verglichen, und bei dem ersten Falle am zwölften Tage 38,2%, am 16. Tage 36,8% Abschwächung der glykolytischen Kraft gefunden. Beim Falle No. 3 zeigten sich am elften Tage 15,2%, beim 4. Falle aber am 17. Tage nur 11,4% Abschwächung; beim zweiten Falle betrug die Abschwächung am 11. Tage 10,3%; der fünfte Fall zeigte am siebenten Tage eine Abnahme um 6,9%. Da aber diese Abnahmen um 10% und weniger innerhalb der physiologischen Schwankungen fallen, so weist eigentlich unter diesen sechs

Tabelle I.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		Erythrozyten (Mill.)	Abschwächung der Glykolyse in %	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythrozyten			
Fall 1									
21. II.	2,790	102	382	109	273	43,7	6,240		Kontrolle
25.	2,770	112	412	110	302	47,2	6,400		Kontrolle
8. III.	2,390	82	325	81	244	40,3	6,080		Seit 4. III. Hunger.
15.	1,940	100	308	146	162	26,9	6,012	38,2	5. T.
19.	1,810	108	436	254	182	27,6	6,592	36,8	12. T.
									16. T. Am 22. III. tot gefunden
Fall 2.									
21. II.	2,815	117	312	70	242	39,6	6,240		Kontrolle
8. III.	2,340	116	335	101	234	35,7	6,560	9,8	Seit 4. III. Hunger.
14.	2,000	98	361	135	226	35,5	6,336	10,3	5. T.
									11. T. Am 20. III. tot gefunden
Fall 3.									
19. III.	2,920	92	366	93	273	41,2	6,620		Kontrolle
24.	2,890	103	331	99	232	42,4	5,468		Kontrolle
									Seit 13. III. Hun- ger
18. IV.	2,400	102	333	48	265	40,4	6,543		6. T.
23.	2,140	129	407	206	201	34,9	5,760	15,2	11. T. Am 26. IV. tot gefunden
Fall 4.									
9. IV.	2,870	104	350	86	264	41,2	6,400		Kontrolle
11.	2,750	83	379	79	300	44,4	6,756		Kontrolle
									Seit 12. IV. Hunger.
23.	2,200	108	434	186	284	44,3	6,400		11. T.
25.	2,150	70	441	125	316	47,0	6,720		13. T.
29.	1,820	127	437	200	237	36,5	6,400	11,4	17. T. Am 30. IV. tot gefunden
Fall 5.									
3. V.	2,630	101	498	224	274	40,4	6,784		Kontrolle
4.	2,630	92	430	150	230	44,2	6,334		Kontrolle
									Seit 7. V. Hunger.
13.	2,385	104	514	259	355	37,6	6,784		7. T.
17.	2,000	109	464	205	259	39,8	6,500	6,9	11. T. Am 19. V. tot gefunden.
Fall 6.									
6. V.	2,330	110	507	179	328	48,6	6,752		Kontrolle
7.	2,330	102	424	77	347	50,9	6,816		Kontrolle
									Seit 13. V. Hunger
20.	2,160	86	364	40	324	49,4	6,560		8. T.
24.	2,070	101	456	186	270	42,3	6,376		12. T.
29.	1,900	95	413	134	279	40,0	6,960		17. T.
1. VI.	1,830	116	424	188	236	39,7	5,952		20. T. Am 6. VI. tot gefunden

Fällen allein der Fall 1 eine unverkennbare Abschwächung auf. Drei andere Fälle mit bzw. 10,3%, 11,4% und 15,2% sind durch eine nur geringfügige Abschwächung gekennzeichnet, während die andern Fälle keine Abschwächung zeigen. Mithin kommt im Hungerzustande die Hämoglykolyse bei Kaninchen dem niedrigsten Normalwerte gleich; man kann also nicht sagen, dass sie bei Hunger eine wesentliche Abschwächung erleide. Und wenn Takayama (1925) an Hühnern, welche chronisch hungerten, experimentell feststellte, dass bei ihnen keine Abschwächung der Hämoglykolyse eintritt, so stimmt diese Beobachtung mit meinen Feststellungen überein.

#### *Veränderung des Körpergewichts.*

Durch Vergleich des Körpergewichts kurz vor Eintritt des Todes mit dem der Kontrolle stellten wir die beobachtete Abnahme desselben in Prozenten fest, wobei sich von dem ersten bis zum sechsten Falle die folgenden Prozentzahlen ergaben: 41,1%; 41,4%; 33,8%; 36,3%; 40,8%; 28,6%; Durchschnitt 37,0%.

#### *Lebensdauer (während des Experiments).*

Vom ersten bis zum letzten Versuchsfalle der Reihe nach aufgezählt, zeigten die Tiere die folgende Lebensdauer nach Tagen: 19, 17, 14, 18, 13 und 25 Tage; Durchschnitt 18 Tage.

#### *Blutzucker.*

In dritten und vierten Falle zeigte sich die Blutzuckermenge um 0,129% bzw. 0,127% gesteigert; in den andern Fällen zeigte sich keine Veränderung.

### III. DIE HAEMOGLYKOLYSE BEI MIT POLIERTEM REIS ERNAEHRTEN KANINCHEN.

#### *Untersuchungsmethode.*

Während man gesunden Kaninchen zugemessene Mengen von Nahrung, nämlich pro kg ihres Körpergewichtes je 100 g Bohnenquark-Treber, etwas "Komatsuna" (ein Kraut) und Mohrrübe zu fressen gab, wurden der Blutzucker in nüchternem Zustande, die

glykolytische Kraft sowie das Körpergewicht festgestellt, und bei einer Anzahl der Kaninchen wurde auch das freie und gebundene Cholesterin im Vollblut sowie im Blutplasma gewogen, um als Kontrolle zu dienen. Dann fütterte man sie mit gut gewaschenem poliertem und ziemlich weich verkochtem Reis in bestimmten Mengen, nämlich pro kg Körpergewicht mit 20 g poliertem Reis, den man aber dann wieder wegliess, sobald Apptitmengel eintrat und die Kaninchen infolgedessen ihr Futter liegen liessen. Je einmal wöchentlich wurden die vorher erwähnten Verhältnisse in beschriebener Weise geprüft und Vergleiche mit der Kontrolle gezogen. Die Untersuchungsmethode der hämoglykolytischen Kraft, die Bestimmungsmethode des Blutzuckers und Cholesterins und die Bestimmung der anderen Verhältnisse war genau die gleiche wie die in der ersten und zweiten Mitteilung schon dargelegte.

#### *Experimentelle Ergebnisse.*

Indem ich bei 15 in Tabelle II aufgeführten, sowie bei drei in Tabelle IV enthaltenen, insgesamt also bei 18 Fällen je die niedrigste glykolytische Kraft der Kontrollzeit mit der glykolytischen Kraft der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen verglich, habe ich die folgenden Befunde erlangt:

Erste Woche: Unter den 17 beobachteten Fällen fanden sich 9 Fälle ohne alle Abschwächung; von Abschwächungen unter 10% aufweisenden 2 Fälle, nämlich der erste und siebente Fall. Da Schwankungen innerhalb von 10% auch in gesundem Zustande aufzutreten pflegen, so können diese 11 Beispiele als Fälle gelten, in denen eine Abschwächung der Glykolyse *nicht* eingetreten ist. Von allen Fällen machen diejenigen, die sich so verhalten, 64,7% aus.

Die Fälle, welche Abschwächungen der Glykolyse im Betrage von 10%–20% aufweisen, nämlich der fünfte und der achte, machen an Häufigkeit 11,8% des Ganzen aus. 20–30% Abschwächung zeigende Fälle sind vier vorhanden, nämlich der zweite, neunte, zehnte und elfte Fall; sie machen 23,5% der Gesamtzahl aus. Während der ersten Woche ist daher eine Abschwächung der glykolytischen Kraft bei mehr als der Hälfte der Fälle noch nicht

Tabella II.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythrozyten			
Fall 1.									
7. XII.	3,875	91	437	191	246	40,0		6,144	Kontrolle
11.	3,880	95	542	247	295	46,3		6,368	Kontrolle
21.	3,725	94	539	321	218	37,2	7,0	5,624	Seit 16. XII. Reis- fütterung 6. T.
31.	3,250	114	551	385	166	26,6	33,5	6,240	16. T.
6. I.	3,115	129	484	295	189	31,2	22,0	6,048	22. T. (Seit 9. I. Diarrhöe).
12.	2,960	120	448	265	183	29,3	26,8	6,240	28. T. (Am 12. I. tot gefunden)
Fall 2.									
22. III.	3,180	114	454	157	297	46,6		6,368	Kontrolle
24.	3,150	103	440	171	269	45,4		5,920	Kontrolle
31.	3,030	85	455	224	231	35,0	22,9	6,080	Seit 25. III. Reis- fütterung 1. Woche
7. IV.	2,955	70	439	277	162	24,7	45,6	6,560	2.
14.	2,750	136	643	416	227	35,3	22,2	5,952	3.
28.	2,330	116	472	290	182	30,0	33,9	6,080	4.
10. V.	2,130	106	403	233	170	30,9	31,9	5,504	38. T.
17.	2,030	92	464	288	128	22,9	49,6	5,600	45. T.
27.	1,910	109	468	302	166	29,6	34,8	5,604	55. T.
1. VI.	1,740	118	534	380	154	22,9	49,6	5,560	60. T. (Am 2. VI. tot gefunden)
Fall 3.									
17. VI.	2,310	91	387	125	272	44,6		6,096	Kontrolle
21.	2,290	110	476	195	281	46,3		6,104	Kontrolle
5. VII.	2,390	114	534	257	277	48,3		5,936	Seit 29. VI. Reis- fütterung 1. Woche
12.	2,170	122	410	179	231	41,7	6,5	5,528	2.
19.	2,080	128	474	230	244	39,1	12,3	6,240	3.
24.	1,990	111	514	343	171	29,7	33,4	5,758	26. T.
4. VIII.	1,870	117	522	348	174	28,1	37,0	6,184	37. (Kreuzversuch)

Table II.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		der Glykolyse in %	Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythrozyten			
Fall 3.									
10. VIII.	1,800	108	450	300	150	26,3	41,0	5,688	43. Tag
14.	1,696	119	537	441	96	21,1	52,7	4,552	47. Tag (Kreuz- versuch)
									Seit 15. VIII. In- jektion von 2ccm Beriberol
21.	1,550	146	423	262	161	34,8	22,0	4,608	1. Woche
28.	1,490	143	493	340	153	34,2	23,5	4,488	Seit 22. VIII. In- jektion von 3ccm Beriberol
3. IX.	1,620	139	592	318	274	49,4		5,544	Seit 28. VIII. Nor- maldiät und In- jektion von 3ccm Beriberol.
10.	1,460	82	395	178	217	42,3		5,128	Seit 4. IX. Reisfüt- terung und In- jektion von 5ccm Beriberol
19.	1,320	97	422	269	157	31,1	30,2	4,984	Seit 15. IX. Beri- berol ausgesetzt
25.	1,450	138	420	185	235	44,4		5,336	Seit 20. IX. Injek- tion von 10ccm Beriberol. Ging am 28. IX zu Grunde.
Fall 4.									
19. VI.	3,760	80	378	91	287	48,4		5,928	Kontrolle
21.	3,680	70	356	58	298	49,0		6,080	Kontrolle
5. VII.	3,500	117	489	239	250	44,6		5,600	1. Woche
12.	3,230	120	418	190	228	38,2	21,0	5,968	2.
19.	3,170	134	382	185	197	33,7	28,3	5,840	3.
22.	3,040	124	460	313	177	30,9	36,2	5,720	24. Tag
31.	2,820	130	493	326	167	29,2	39,6	5,720	33. (Kreuzversuch)
9. VIII.	2,430	121	421	302	119	23,6	49,2	5,040	42. Tag (Am 13. VIII. tot gefun- den)
Fall 5.									
12. VII.	3,240	87	521	289	262	44,5		5,890	Kontrolle
									Seit 13. VII. Reis- fütterung
19.	3,170	120	599	380	219	37,8	15,0	5,792	1. Woche
25.	2,770	124	499	291	208	36,6	17,8	5,680	13. Tag
1. VIII.	2,700	124	409	243	166	30,5	31,5	5,440	20. "
8.	2,580	127	364	234	130	23,6	47,0	5,520	27. (Am 13. VIII. tot gefunden)

Tabelle II.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythrozyten			
Fall 6.									
11. VIII.	3,000	95	541	265	276	43,1		6,400	Kontrolle
14.	3,100	104	642	364	278	43,1		6,448	Kontrolle
22.	2,970	107	379	97	282	44,1		6,400	Seit 16. VIII. Reis- fütterung 1. Woche
28.	2,540	100	408	161	242	36,9	14,4	6,560	13. Tag
3. IX.	2,320	87	469	262	207	32,3	25,1	6,400	19.
10.	2,050	94	452	254	198	29,0	34,5	6,816	26.
16.	1,890	126	652	469	183	29,3	33,8	6,240	32. Am 18. IX. tot gefunden
Fall 7.									
29. VIII.	2,580	101	498	224	274	43,9		6,240	Kontrolle
2. IX.	2,560	108	440	198	242	40,3		6,000	Kontrolle
9.	2,500	121	330	129	224	36,6	9,2	6,120	Seit 3. IX. Reisfüt- terung 1. Woche
18.	2,320	81	397	166	231	36,9	8,4	6,248	16. Tag
23.	2,000	142	482	314	168	29,1	27,8	5,768	3. Woche
30.	1,830	145	559	387	172	29,5	26,8	5,840	4.
9. X.	1,650	124	547	393	154	26,5	30,2	5,720	37. Tag. Am 17. X. tot gefunden
Fall 8.									
1. IX.	2,530	108	475	219	256	42,3		6,048	Kontrolle
3.	2,560	104	563	281	282	44,4		6,360	Kontrolle
9.	2,530	95	491	279	212	34,6	18,2	6,136	Seit 3. IX. Reisfüt- terung. 1. Woche
16.	2,360	151	469	292	177	30,0	29,1	5,864	2.
23.	2,030	70	450	258	192	31,5	25,6	6,088	3.
30.	2,090	119	472	309	163	26,6	37,1	6,120	4.
7. X.	2,000	116	572	395	177	29,0	31,4	6,080	5. (Kreuzversuch)
14.	2,080	107	445	235	210	33,7	20,3	6,240	Seit 7. X. Injektion von Icem Otimon 1. Woche
21.	1,920	126	523	403	120	22,0	48,0	5,455	2.

Tabelle II.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythrozyten			
Fall 8.									
28. X.	2,230	102	436	202	234	36,5	13,7	6,400	Seit 22. X. Otimon ausgesetzt und Injektion von 1ccm Beriberol
1. XI.	2,100	129	699	563	136	27,2	35,7	5,000	11. T.
10.	2,320	96	526	254	272	44,1		6,166	Seit 1. X. Normal- diät
17.	2,100	133	597	425	172	31,6	25,3	5,440	Seit 11. X. Reisfüt- terung
24.	2,000	170	682	523	159	30,9	27,0	5,136	1. W. 2. W. Seit 25. XI. Injek- tion von 10 ccm Beriberol
29.	2,180	101	721	511	210	35,7	15,6	5,880	5. T. (Kreuzver- such)
4. XII.	2,200	103	582	293	289	42,5		6,800	10. T.
9.	2,000	105	655	397	258	41,6		5,616	15.
Fall 9.									
25. IX.	2,560	111	474	164	310	46,5		6,608	Kontrolle
28.	2,500	88	416	151	265	43,6		6,008	Kontrolle
									Seit 28. IX. Reis- fütterung.
4. X.	2,350	87	344	168	176	30,5	30,0	5,768	1. W.
11.	2,200	134	431	263	168	29,0	33,5	5,760	2. W.
18.	1,950	105	440	281	159	29,2	33,0	5,450	3. W.
28.	1,610	92	633	476	157	27,6	36,7	5,670	31. T.
7. XI.	1,550	92	559	386	173	28,8	33,9	6,008	Seit 29. X. Injek- tion von 1ccm Oti- mon
15.	1,500	93	652	469	183	30,0	31,2	6,120	10. T. 18. T.
29.	2,200	104	421	133	288	45,0		6,400	Seit 16. XI. Nor- maldiät
7.	2,370	125	721	535	186	29,9	31,4	6,120	2. W. Seit 1. XII. Reis- fütterung
									1. W.
15.	2,230	102	467	323	144	24,7	43,3	5,840	Seit 9. XII. Injek- tion von Insulin
20.	1,980	84	449	261	188	30,4	30,2	6,176	1. W. 12. T. (Am 23. XII. tot gefunden.)

Tabelle II.

Datum	Körpergewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerab- nahme		Abschwächung der Glykolyse in %	Erythrozyten (Mill.)	Bemerkungen
			Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^5$ Mill. Erythrozyten			
Fall 10.									
5. XI.	2,400	103	582	293	289	42,5		6,800	Kontrolle
9.	2,460	104	563	281	282	45,2		6,240	Kontrolle
16.	2,400	97	671	477	194	31,5	25,8	6,168	Seit 10. XI. Reis- fütterung
23.	2,230	105	655	397	258	41,6		6,200	1. W. Seit 17. XI. Injek- tion von Insulin
28.	1,900	100	545	357	188	31,1	24,5	6,048	1. W. 12. T.
8.	1,600	99	833	635	198	33,2	21,8	5,960	22. T. (Am 13. XII. tot gefunden)
Fall 11.									
10. XI.	2,590	101	417	133	284	44,4		6,400	Kontrolle
15.	2,500	131	671	465	206	33,2	25,2	6,200	Seit 10. XI. Reis- fütterung
23.	2,560	113	589	449	140	22,9	48,4	6,096	1. W.
25.	2,010	122	683	543	140	22,4	49,5	6,240	2. W.
30.	1,850	99	369	197	173	27,4	38,3	6,312	16. T. Seit 25. XII. Injek- tion von Insulin
Fall 12.									
1. XII.	2,700	117	546	287	259	41,5		6,240	Kontrolle
4.	2,760	81	615	366	250	42,1		5,920	Kontrolle
10.	2,690	116	654	392	262	42,0		6,236	Seit 4. XII. Reis- fütterung
17.	2,480	116	698	520	178	29,9	27,0	5,960	1. W.
22.	2,040	127	589	425	166	28,1	34,7	5,840	2. W. Seit 18. XII. Injek- tion von Phos- phatpufferlösung
25.	1,670	107	705	601	104	18,7	54,9	5,560	5. T.
4. I.	2,350	91	611	378	233	39,8		5,848	8. T. Seit 25. XII. Nor- maldiät
11.	2,400	89	610	441	169	29,6	29,6	5,784	11. T. Seit 4. I. Reisfüt- terung
18.	1,910	95	634	462	172	27,1	34,7	6,352	8. T. Seit 11. I. Injektion von Phosphat- pufferlösung.
8. T.									



ersichtlich; der durchschnittliche Grad der erfolgten Abschwächung beläuft sich auf 22,9%.

*Zweite Woche:* Unter den 17 untersuchten Beispielen zeigen zwei Fälle noch keinerlei Abschwächung; es sind dies der dritte und der siebente Fall; also sind durch diese von allen Fällen 11,8% vertreten. Eine Abschwächung unter 20% weisen vier Fälle, nämlich der fünfte, sechste, 17. und 18. Fall auf, was 23,4% der Zahl der Gesamtfälle entspricht. Abschwächungen von zwischen 20 und 30% aufweisende Fälle sind sechs vorhanden, nämlich der 4., 8., 12., 13., 14. und 16. Fall; sie repräsentieren 35,3% der Gesamtzahl der Fälle. Abschwächungen zwischen 30% und 40% zeigen sich an drei Fällen, nämlich an Fall 1, 9 und 15; ihre Anzahl ist gleich 17,6% der Gesamtzahl. Abschwächungen von über 40% erleiden wiederum zwei Fälle, nämlich der Fall No. 2 und No. 11, gleich 11,8% aller Fälle. Mithin zeigt während der zweiten Woche eine sehr grosse Zahl, nämlich 88,2% der Gesamtzahl, eine Abschwächung der Glykolyse, und der Grad dieser Abschwächung beträgt zwischen 20% und 40%, im Durchschnitt 24,4%.

*Dritte Woche:* Die 15 experimentell beobachteten Fälle zeigen allesamt eine Abschwächung ihrer glykolytischen Kraft. Was den Grad dieser Abschwächung betrifft, so ist ein Fall mit einer Abschwächung von über 40% vorhanden, nämlich der Fall No. 16, gleich 6,7% der Gesamtzahl. Mit Abschwächungen von über 30% zeigen sich vier Fälle, nämlich die Fälle No. 5, 9, 13 und 18, entsprechend 26,7% der Gesamtzahl. Abschwächungen von 20% bis zu 30% sind bei neun Fällen vorhanden, nämlich bei den Fällen No. 2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 15 und 17, gleich 66% der Gesamtzahl der Fälle. Unter 20% Abschwächung zeigt ein Fall; es ist dies No. 3, entsprechend 6,7% der Gesamtzahl der Fälle. Der Abschwächungsgrad stellt sich im Durchschnitt aller Fälle auf 27,4%.

*Vierte Woche:* Die untersuchten zehn Fälle weisen sämtlich Abschwächungen der Glykolyse auf. Dabei zeigen Abschwächungen von unter 30% zwei Fälle, nämlich Fall 1 und Fall 7, gleich 20% der Gesamtzahl. Mit Abschwächungen zwischen 30% und 40% figurieren sieben Fälle (Fall 2, 3, 4, 6, 8, 13 und 15),

gleich 70% der Gesamtzahl. Eine Abschwächung von über 40% weist nur ein Fall auf, nämlich No. 5, gleich 10% der Gesamtzahl. Der Grad der Abschwächung beträgt im Durchschnitt 35,2%. Mithin ist eine noch erheblichere Abschwächung als in der zweiten und dritten Woche eingetreten.

*Fünfte Woche:* Indem nach der vierten Woche eine Anzahl der Kaninchen gestorben und wegen anderer Ursachen ausgeschieden waren, und die Untersuchungen nur noch an den vier übrig gebliebenen Fällen fortgesetzt wurden, zeigt sich der Abschwächungsgrad der Glykolyse am Falle No. 4 als 39,6%, am Falle No. 6 als 33,8%, am Falle No. 8 als 31,4%, an Fall 9 als 36,7%; der Durchschnitt beträgt 35,4%. Im Verhältnis zur Vorwoche hat sich also der Abschwächungsgrad nicht weiter verschärft.

Von der sechsten bis zur siebenten Woche (vom 37. bis zum 47. Tage) waren zur Beobachtung noch verfügbar vier Fälle, nämlich Fall 2, 3, 4 und 7. Der Grad der Abschwächung betrug im Durchschnitt 41,7%. Die Zahl der beobachteten Fälle war gering, aber beim Vergleich zwischen den einzelnen Wochen zeigt sich der Grad der Abschwächung während der sechsten Woche als 37,1%, in der siebenten Woche als 47,8%.

Von da ab war als noch am Leben geblieben nur noch der Fall No. 2 übrig; am 55 Tage zeigte er 34,8% und am 60 Tage 49,6% Abschwächung.

Wie bereits oben dargelegt wurde, ist, wenn man Kaninchen mit poliertem Reis füttert, während der ersten Woche in mehr als der Hälfte der Versuchsfälle, nämlich bei 64,7% derselben, noch keine Abschwächung der Glykolyse eingetreten. Wenn man nun die mit Abschwächung behafteten Fälle betreffs des Grades dieser Abschwächung betrachtet, so beläuft sich dieser im Durchschnitt auf 24,4%. In der zweiten Woche zeigt eine grosse Anzahl, nämlich 84,6% der Kaninchen eine Abschwächung der Glykolyse, deren durchschnittlicher Abschwächungsgrad 25,8% beträgt. In der dritten Woche zeigen sämtliche Experimentfälle solche Abschwächungen; ihr Grad beträgt im Durchschnitt 25,6%. Auch in der vierten Woche erfahren alle Fälle Abschwächungen, deren Durchschnittsgrad sich auf 35,2% beläuft. Von da ab hat sich

mit dem Absterben der Tiere die Anzahl der Fälle beträchtlich vermindert; wenn man aber an diesen Fällen die Beobachtungen fortsetzt, so zeigt sich, dass in der fünften Woche der Abschwächungsgrad derselbe bleibt wie in der Vorwoche, die sechste Woche hingegen wieder eine Neigung zur Erhöhung des Abschwächungsgrades aufweist, und in der siebenten Woche sich der Abschwächungsgrad auf durchschnittlich 47,8% beläuft.

#### IV. KREUZVERSUCH ZWISCHEN MIT POLIERTEM REIS GEFÜETTERTEN UND GESUNDEN KANINCHEN.

Wenn man Kaninchen mit poliertem Reis füttert, so wird, wie früher bereits erwähnt wurde, die Hämoglykolyse von der zweiten Woche an abgeschwächt. Um nun dieser abschwächenden Wirkung auf den Grund zu kommen und festzustellen, welches Verhältnis dabei zwischen dem Blutserum und den Blutzellen bestehe, wurde das Blut von mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen mit demjenigen gesunder Kaninchen, indem man die resp. Sera von ihren Blutkörperchen trennte, zum Zweck der Feststellung der Glykolyse in den folgenden Weisen vermischt:

1. Blut von mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen,
2. Blut gesunder Kaninchen,
3. Serum der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen, gemischt mit den Blutkörperchen von gesunden Kaninchen,
4. Die Blutkörperchen von mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen, gemischt mit dem Serum gesunder Kaninchen.

Wie aus der obigen Tabelle II ersichtlich ist, zeigt sich in den Fällen No. 1, 3, 6 und 8 die beim Serum auftretende abschwächende Wirkung recht schwach, oder sie ist garnicht vorhanden. Wenn man nämlich an den verschiedenen Fällen die sich beim Serum zeigende Abschwächung beobachtet, so zeigt sie dabei Grade von 12,10%, 15,3%, 0%, 18,6%; bei den Blutkörperchen hingegen zeigen sich Abschwächungsgrade von 41,0%, 38%, 40,8%, 30,5%; also ist in diesem Falle die Abschwächung durchaus deutlich. Die Zahlen für die seit dem Beginn der Fütterung mit poliertem Reis verflossenen Tage betragen dabei für die einzelnen Fälle: 37 Tage, 33 Tage, 16 und 29 Tage. Diese Zahlen sind für die einzelnen

Tabelle III.

Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme		Abschwächung der Glykolyse	Erythro- zyten (Mill.)	Bemerkungen
	Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn	in mg	zu $1 \times 10^6$ Mill. Erythro- zyten			
Fall 1.							
1							
2	522	348	174	28,1	37,0	6,184	Das Blut von Kaninchen No. 3 auf Tabelle II, am 17. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 37. nach Fütterung mit poliertem Reis.
3	496	242	254	42,2		6,016	
3	530	300	230	37,1	12,1	6,200	
4	450	300	150	26,3	41,0	5,688	
Fall 2.							
1	537	441	96	21,1	52,7	4,552	Das Blut von Kaninchen No. 3 auf Tabelle II, am 27. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 47. nach Fütterung mit poliertem Reis.
2	642	364	278	43,1		6,448	
3	527	363	161	27,0	37,4	6,056	
4	516	354	162	26,5	40,5	6,120	
Fall 3.							
1	493	326	167	29,2	39,6	5,720	Das Blut von Kaninchen No. 4 auf Tabelle II, am 20. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 33. nach Fütterung mit poliertem Reis.
2	541	265	276	43,1		6,400	
3	500	269	231	36,5	15,3	6,320	
4	435	246	189	30,0	38,0	6,120	
Fall 4.							
1	572	395	177	29,0	31,4	6,080	Das Blut von Kaninchen No. 8 auf Tabelle II, am 29. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse, d. h. am 35. Anachfütterung mit poliertem Reis.
2	670	345	325	45,7		7,112	
3	340	152	188	30,7	32,8	6,120	
4	539	385	154	29,7	29,8	5,168	

Tabelle III.

Nummer der Probe	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnahme		Abschwä- chung der Glykolyse	Erthryo- zyten (Mill.)	Bemerkungen
	Vor dem Versuch	Nach 24 Stdn.	in mg	zu 1×10 <sup>6</sup> Mill. Erthryo- zyten			
				Fall 5.			
1	721	511	210	35,7	15,6	5,880	Von Kaninchen No. 8 auf Tabelle II entnommes Blut, dessen glykolyti- sche Kraft durch Injektion von Beriberol im Zustand der Erholung ist.
2	897	625	272	43,6		6,240	
3	738	522	216	40,3	7,6	5,360	
4	746	559	187	33,2	12,0	5,640	
				Fall 6.			
1	683	543	140	22,4	49,5	6,240	Das Blut von Kaninchen No. 11 auf Tabelle II, am 10. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 16. nach Verfütterung von poliertem Reis.
2	503	226	277	44,0		6,180	
3	775	522	253	41,5		6,080	
4	745	559	188	26,3	40,8	6,400	
				Fall 7.			
1	832	654	178	28,3	39,5	6,280	Das Blut von Kaninchen No. 13 auf Tabelle II am 13. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 27. nach Verfütterung von poliertem Reis.
2	562	266	296	43,9		6,712	
3	976	734	242	33,7	23,2	7,184	
4	811	654	157	29,1	29,5	5,392	
				Fall 8.			
1	602	492	110	25,4	43,4	4,392	Das Blut von Kaninchen No. 14 auf Tabelle II am 17. Tage nach begin- nender Abschwächung der Glykolyse d. h. am 29. nach Verfütterung von poliertem Reis.
2	596	306	290	43,1		6,734	
3	701	507	194	35,1	18,6	5,512	
4	508	365	143	29,1	30,5	4,912	

Fälle verschieden; wenn man aber vom Eintrittstage der Abschwächung der Glykolyse zu zählen beginnt, so handelt es sich um den 17., den 20., 10. und den 17. Tag. Der sechste, am 10. Tage beobachtete Fall weist im Serum gar keine abschwächende Wirkung auf; beim zweiten und vierten Falle jedoch zeigen die im Serum und in den Blutkörperchen platzgreifenden abschwächenden Wirkungen fast den gleichen Wert. Im zweiten Falle beträgt derselbe im Serum 37,4%, in den Blutkörperchen 40,5%; beim vierten Falle sind die entsprechenden Zahlen 32,8% bzw. 29,8%. Seit dem Tage, an welchem die Abschwächung der Glykolyse zuerst in die Erscheinung trat, ist dies der 27. bzw. 29. Tag.

Nach den oben angeführten experimentellen Ergebnissen zeigt sich vom Auftreten der Abschwächung der Glykolyse an gerechnet am etwa 20sten Tage im Serum diese Abschwächungswirkung noch nicht, oder sie ist wenigstens noch ganz geringfügig. Dann im Verlaufe der Zeit, wenn der 27. Tag und weitere herankommen, fangen das Serum sowohl als die Blutkörperchen in gleicher Weise an die abschwächende Wirkung zu zeigen. Aber bei dem siebenten Falle ist schon am 13. Tage seit dem Auftreten der Abschwächung plötzlich auch im Serum eine Abschwächung um 23% vorhanden; die an den Blutkörperchen wahrnehmbare Abschwächung beträgt zur selben Zeit 29,5%. Die im Serum zutage tretende Abschwächung ist geringer als die in den Blutkörperchen vor sich gehende; aber verglichen mit den anderen Fällen, stehen doch die Befunde an beiden Stoffen verhältnismässig einander sehr nahe.

Im Falle No. 5 kehrt nun, nachdem man nach Abschwächung der Glykolyse Beriberol injiziert hat, die Glykolyse auf ihren Normalwert zurück; und wenn man zu dieser Zeit die Untersuchung vornimmt, so zeigt sich am Serum nur eine Abschwächung um 7,6%, an den Blutkörperchen nur eine solche um 12,0%.

#### V. BLUTZUCKER DER MIT POLIERTEM REIS GEFÜTTERTEN KANINCHEN.

In dem wir 18 Fälle von mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen in nüchternem Zustande in Bezug auf den Blutzucker-

gehalt mit der Kontrolle und mit einander verglichen (Siehe Tabellen II und IV), fanden wir in der ersten und zweiten Woche eine Steigerung desselben bei 12 Fällen (während der ersten Woche 7, während der zweiten 5 Fälle), was 66,7% der Gesamtzahl gleichkommt.

Von der dritten Woche ab wiesen eine Steigerung auf drei Fälle gleich 16,7% der Gesamtzahl; ausserdem sind noch drei Fälle vorhanden, welche von Anfang bis zu Ende keine Steigerung erlitten, gleich ebenfalls 16,7% des Ganzen. Der Grad dieser Steigerung des Blutzuckers beträgt, verglichen mit der Kontrolle, 13–42 mg, im Durchschnitt 29,5 mg. Als absoluter Wert derselben fand sich 106–151 mg%. Und wenn man nun jetzt das zeitliche Verhältnis zwischen dem Auftreten der Zunahme des Blutzuckers und der Abschwächung der Glykolyse in Betracht zieht, so hat Takemoto (1927) bei der Reiskrankheit der Hühner festgestellt, dass die Abschwächung der Glykolyse vor dem Anstiege des Blutzuckers einsetzt. Auch Takayama (1925) hat bei Hühnern Untersuchungen angestellt und gesagt, die Abschwächung der Glykolyse erscheine nach der Zunahme des Blutzuckers. Ich selbst habe nun meine Untersuchungen an Kaninchen vorgenommen und gefunden, dass in fünf Fällen der Blutzucker-Anstieg vor der Abschwächung der Glykolyse erfolgte, habe aber von Fällen, wo er nach der Abschwächung der Glykolyse eintrat, ebenfalls fünf gefunden; dann fand ich weitere fünf Fälle, in denen beide Erscheinungen gleichzeitig vor sich gingen, endlich aber auch drei Fälle, bei welchen von Anfang bis zu Ende der Blutzucker überhaupt keine Zunahme aufwies. Takemoto's und Takayama's an Hühnern beobachtete ganz bestimmte Zeitfolge-Verhältnisse vermochte ich mithin an Kaninchen nicht festzustellen.

#### VI. DAS KÖRPERGEWICHT DER MIT POLIERTEM REIS GEFÜTTERTEN KANINCHEN.

Wenn man Kaninchen mit poliertem Reis füttert, so tritt vom Beginn der zweiten Woche ab in vielen Fällen ein Nachlassen des Appetites ein. Infolge dessen ist es auch verständlich, dass das Körpergewicht allmählich eine Abnahme erfährt. Auch unter den

jetzt untersuchten 18 Fällen zeigten während der ersten Woche 12 eine Abnahme; aber der Grad der Abnahme betrug, verglichen mit der Kontrolle, nur zwischen 0,6 und 10,8%, im Durchschnitt 3,2%. In einem Beispiel zeigte sich keine Änderung; die übrigen Fälle hingegen wiesen Zunahmen von 1,7–4%, im Durchschnitt von 2,8% auf. In der zweiten Woche zeigten die 17 untersuchten Fälle sämtlich Abnahmen, nämlich um 1,2–16,2%, im Durchschnitt 9,4%. Von da ab wird der Appetit nach und nach schlechter, und demgemäss steigt in der dritten Woche die Abnahme des Körpergewichts auf 9,6–23,9%, oder zu einem Durchschnittswert von 15,9% an. Mit der weiteren Fortsetzung der Untersuchungen stellte sich in der vierten und fünften Woche eine hohe Zahl von Todesfällen ein; und die Abnahme des Körpergewichts unmittelbar vor dem Tode betrug 23,7–45,0%, Durchschnitt 26,6%.

VII. DER EINFLUSS VERSCHIEDENER KÖRPER AUF DIE  
HÄMOGLYKOLYSE DER MIT POLIERTEM REIS  
GEFÜTTERTEN KANINCHEN.

*Einfluss des Otimons.*

Wenn man Kaninchen mit poliertem Reis füttert, so wird in gleichem Masse mit einer Abschwächung der Glykolyse der Appetit der Kaninchen schlecht; ihr Körpergewicht nimmt ab, Diarrhöe, Haarausfall, von den Hinterbeinen ausgehende Lähmung und andere Symptome pflegen aufzutreten; und schliesslich gehen die Tiere an Entkräftung zugrunde. Hierbei habe ich appetitfördernde Mittel verabfolgt, die geschwächten Kaninchen wieder zur Erholung gebracht und darauf untersucht, ob bei ihnen auch die abgeschwächte Hämoglykolyse wieder zur Erholung zurückkehrt; und zwar habe ich ihnen vor Verabfolgung des Futters je 1 ccm Otimon subkutan injiziert und die Wirkung desselben beobachtet.

Wie die Tabelle II zeigt, haben die Fälle No. 8 und No. 9 in der fünften Woche und am 31. Tage seit der Fütterung mit poliertem Reis eine Abschwächung ihrer glykolytischen Kraft um 31,4% bzw. 36,7% aufgewiesen; von dieser Zeit an wurde mit

der Injektion des Otimons begonnen, und nach einer Woche bzw. nach 10 Tagen wurden Abschwächungen von 20,3% bzw. 33,9% beobachtet. Dabei hat sich also der Fall No. 8 etwas erholt; aber in der folgenden Woche erreichte bei ihm die Abschwächung den Grad von 48%. Fall 9 hatte am 18. Tage eine Abschwächung um 31,2% gezeigt; die glykolytische Kraft hat sich bei ihm nicht erholt. Da sich also gezeigt hatte, dass nach Abschwächung der glykolytischen Kraft eine Erholung derselben mittels Otimons sich nicht erzielen lässt, habe ich dann diese Untersuchung nicht weiter fortgesetzt. In nüchternem Zustande vorhandenem Blutzucker gegenüber zeigt Otimon durchaus keinen Einfluss.

#### *Einfluss des Insulins.*

Bezüglich des Einflusses, den das Insulin auf die hämoglykolytische Kraft gesunder Kaninchen ausübt, hat Kawashima (1924) Untersuchungen angestellt, wobei er feststellte, dass sich in vitro et in vivo keinerlei solcher Einfluss nachweisen lässt. Homma (1927) und Joshiki (1929) haben mittelst Pankreas-Exstirpation an Hunden eine Abschwächung der Hämoglykolyse festgestellt und gefunden, dass, wenn man diesen Hunden dann Insulin injiziert, eine Erholung der Glykolyse eintrete. Ich habe nunmehr an mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen, deren glykolytische Kraft abgenommen hatte, den Einfluss der Injektion von Insulin untersucht; und zwar habe ich solchen Kaninchen mit abgeschwächter Hämoglykolyse täglich Insulin (Toronto) in einheitlicher Menge injiziert, und sodann ihre glykolytische Kraft einer Untersuchung unterzogen.

Wie die Tabelle II zeigt, sind in den Fällen No. 9, 10, 11 am 7., 7. und 16. Tage nach dem Anfang der Fütterung mit poliertem Reis Abschwächungen der Glykolyse um 31,4%, 25,8% und 49,5% erwiesen. Von dieser Zeit ab wurde die Injektion des Insulins in die Wege geleitet; und von den Fällen No. 9 und No. 10, die ich nach einer Woche, sowie dem 11. Fall, den ich am sechsten Tage prüfte, zeigte der Fall 10 eine Erholung der glykolytischen Kraft zum Kontrollwert; die Fälle 9 und 11 wiesen dagegen 43,3% bzw. 38,8% Abschwächung, also keine Erholung der Glykolyse

auf. Der Fall No. 11 schien sich sodann in Bezug auf die Glykolyse wieder etwas zu erholen; aber da die Körperkräfte nicht ausreichten, starb das Tier zwei Tage später. Der Fall 9 zeigte am 11. Tage noch 30,2% Abschwächung, was derjenigen vor der Injektion gleichkommt. Fall No. 10 wies noch eine Abschwächung um 24,5% auf; der Fall 9 starb drei Tage danach. Als Fall 10 am 22. Tage untersucht wurde, hatte er noch eine Abschwächung um 21,8%, und das Tier starb fünf Tage später.

Aus den obigen Untersuchungen ergibt sich, dass die durch den Genuss von poliertem Reis abgeschwächte Hämoglykolyse der Kaninchen sich nach Verabfolgung von Insulin nur selten einigermaßen erholt, dass dann aber wieder Abschwächung platzgreift, und infolgedessen eine endgültige Erholung nicht erreicht wird, die Kaninchen vielmehr an Entkräftung zugrunde gehen.

Betreffs des im nüchternen Zustande vorhandenen Blutzuckers zeigte sich an denjenigen Fällen, welche vor der Injektion von Insulin eine Zunahme des Blutzuckers aufgewiesen hatten, nämlich den Fällen No. 9 und No. 10, deutlich ein Abstieg desselben nach der Injektion; im Gegensatze hierzu wies aber der Fall No. 13, welcher zwar eine Abschwächung der Glykolyse, aber keine Veränderung des Blutzuckers gezeigt hatte, auch nach der Injektion von Insulin kaum eine Änderung im Blutzucker auf.

#### *Einfluss der Phosphatpufferlösung.*

\* Kawashima (1924) hat die Erythrozyten von Kaninchen und Pferden mit Phosphatpufferlösung von Blut gleicher Alkaleszenz gemischt und nachgewiesen, dass hierbei die glykolytische Kraft noch mehr als bei der Vermischung mit physiologischer Kochsalzlösung ansteigt; er zeigte auch, dass die glykolytische Kraft dabei auf das Doppelte und darüber steigt.

Ich habe nun Kaninchen, deren glykolytische Kraft durch die Fütterung mit poliertem Reis abgeschwächt war, täglich Phosphatpufferlösung, je 5 ccm, intravenös injiziert, und während des Verlaufes die Glykolyse beobachtet.

Als Phosphatpufferlösung wurde m/7  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , m/7  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kahlbaum) gemischt und, kolorimetrisch zu  $\text{P}_\text{H}$  ca. 7,3 bestimmt,

verwendet.

Wie in der Tabelle II gezeigt ist, zeigen die Fälle No. 12, 13 und 14 in der zweiten Woche, sowie am 27. Tage und am 28. Tage Glykolyse-Abschwächungsgrade von 27%; 39,5%; 23,2%; von dieser Zeit ab wurde mit der Injektion begonnen. Der Fall No. 12 wurde am fünften und achten Tage untersucht, und es wurden dann bei ihm Abschwächungen um 34,7% bzw. 54,9% festgestellt; da dieses Kaninchen mithin sehr schwach war, wurde ihm wieder gewöhnliche Diät gegeben, worauf es wieder gekräftigt wurde. Dann wurde abermals mit der Fütterung von poliertem Reis begonnen; und am elften Tage danach erwies sich eine Abschwächung um 29,6%. Von dieser Zeit ab wurde wieder Phosphatpufferlösung injiziert, und es wurden am achten Tage danach, sowie bei den Fällen No. 13 und No. 14 am 12. und 9. Tage wieder Untersuchungen vorgenommen, wobei sich Abschwächungen um 34,7% bzw. 36,5% und 43,4% zeigten. In jedem Falle ist also eine noch deutlichere Abschwächung als vor der Injektion in Erscheinung getreten, wodurch bewiesen ist, dass durch die Injektion von Phosphatpufferlösung eine Erholung der geschwächten hämoglykolytischen Kraft nicht erzielt werden kann.

### *Einfluss von Vitamin-B.*

Wenn man Kaninchen mit poliertem Reis füttert, so nimmt nach dem Eintritt von Appetitmangel deren Körpergewicht ab, und sie werden sehr geschwächt. Da die Diät nur aus poliertem Reis besteht, sind Eiweiss, Salze und die verschiedenen Klassen von Vitamin mangelhaft vorhanden, und es werden dadurch Ernährungsstörungen hervorgerufen, wodurch wieder Stoffwechselstörungen deutlich in Erscheinung treten. Dass auch die Hämoglykolyse dabei abgeschwächt wird, zeigt sich in Übereinstimmung zu den oben geschilderten Untersuchungen.

Ich habe nun von diesen mangelnden Nahrungstoffen einen, das Vitamin-B, ersetzt, und den sich daraus ergebenden Einfluss auf die Hämoglykolyse beobachtet. Das Vitamin-B habe ich in der Form des Beriberols zur Anwendung gebracht; reines Beriberol wurde in sterilem destilliertem Wasser in 2% Lösung, bei

100°C 30 Minuten lang durch Dampf desinfiziert, und dann subkutan injiziert.

Wie in den Experimenten der Tabelle II zu ersehen ist, hat der Fall 3 am 47. Tage seit der Fütterung mit poliertem Reis eine Abschwächung der Glykolyse um 52,7% gezeigt; von diesem Tage ab wurden täglich je 2 ccm Beriberol subkutan injiziert; als wir dann eine Woche später die Beobachtung anstellten, fand sich noch eine Abschwächung um 22%, wonach sich also die Glykolyse beträchtlich erholt hatte; von da ab wurden nun täglich 3 ccm Beriberol injiziert, und es wurde beobachtet, dass nach einer Woche die Abschwächung der Hämoglykolyse 23,5% betrug, also fast derjenigen der vorhergehenden Woche gleich war. Da nun das Kaninchen sehr schwach war, wurde von da ab wieder gewöhnliches Futter gegeben und gleichzeitig mit der Beriberol-Injektion fortgefahren; nach Verlauf von sechs Tagen war dann die glykolytische Kraft normal geworden; dabei hatte auch das Körpergewicht zugenommen, und die Stimmung war gut geworden. Dann wurde abermals mit der Verfütterung von poliertem Reis begonnen, und es wurden täglich 5 ccm Beriberol injiziert. Darauf wurde untersucht, wie sich inzwischen die wiederhergestellte glykolytische Kraft weiter verhalten habe. Dabei zeigte sich nach einer Woche wieder die ursprüngliche glykolytische Kraft. Als dann mit der Verabfolgung von Beriberol innegehalten wurde, und man zugleich wieder mit poliertem Reis fütterte, ergab sich ein Verlauf, den wir zugleich mit dem der andern Fälle nun im folgenden darstellen wollen:

Die Fälle No. 3, 8, 13, 14 und 15 (in der Tabelle No. II aufgeführt) (denen jeden Tag eine Beriberol-Injektion von je 10 ccm verabfolgt wurde) zeigen vor der Beriberolinjektion Glykolyse-Abschwächungen um 30,2%; 48%; 36,5%; 43,4% und 36,9%. Nach der Injektion am 6., 7., 7., 8. und 8. Tage wiesen die Fälle No. 3 und No. 15 ganz den normalen Wert auf; die Fälle 8, 10 und 14 zeigten Abschwächungen um 13,7%, 21,6% bzw. 24,3%; in allen Fällen ist also eine Erholung der Glykolyse gegenüber der Zeit vor der Injektion ersichtlich. Danach zeigten die Fälle No. 3 und No. 14 neben allgemeiner Körperschwäche

Diarrhöe und Lähmungserscheinungen, und die Tiere starben nach 3 bzw. 9. Tagen. Von den Fällen No. 8, 13 und 15 zeigte am 11. Tage, nach zwei Wochen, sowie am 15. Tage der Fall No. 8 eine Abschwächung um 35,7%; bei den anderen beiden Fällen hingegen war die Glykolyse normal. Da der Fall No. 8 von da ab sehr schwach wurde, so wurde bei ihm die Untersuchung abgebrochen. Bei den Fällen 13 und 15 war in der dritten Woche und am 22. Tage die Glykolyse wieder normal. Fall No. 15 wurde unter gleichzeitiger Diarrhöe sehr schwach und starb zwei Tage darauf. Da auch der Fall 13 der Entkräftung anheimfiel, so brach ich bei ihm die Untersuchung ab. Nachdem dem Falle No. 8 dann gewöhnliches Futter verabreicht worden, und nach Wiederherstellung der Gesundheit abermals polierter Reis verfüttert worden war, betrug die Abschwächung der Glykolyse 27%. Von da ab wurde Beriberol injiziert, und am fünften Tage noch eine Abnahme der Glykolyse um 15,6% festgestellt, am zehnten und 15. Tage war die Glykolyse normal geworden; aber von da ab fünf Tage später starb das Tier.

Wie sich aus den obigen Untersuchungsergebnissen ergibt, nähert sich, nachdem die Abschwächung der Glykolyse sich auf 30%–40% belaufen hatte, auf die Injektion von Vitamin-B (10ccm 2% Beriberollösung) hin nach einer Woche der Wert der Glykolyse der Norm. In der zweiten Woche kehrt derselbe völlig auf den Normalwert zurück. Mithin hat Vitamin-B die Wirkung, die bei Fütterung mit poliertem Reis abgeschwächte Glykolyse bei Kaninchen zum Normalwert zurück zu bringen. Aber betreffs des Appetits, und in Bezug auf den Kräfteverfall wird bei den Kaninchen dadurch keine Besserung erzielt, die Tiere sterben vielmehr nach allmählichem Kräfteverfall.

Der Blutzucker in nüchternem Zustande zeigte bei drei unter fünf Fällen auf Injektion von Beriberol hin, und gleichzeitig mit der Erholung der Glykolyse, eine Abnahme, und näherte sich dem Kontrollwerte; die übrigen beiden Fälle wiesen dagegen eine gewisse Zunahme desselben auf.

VIII. VERHAELTNIS DER ABSCHWÄCHUNG DER GLYKOLYSE  
IM BLUTE DER MIT POLIERTEM REIS GEFÜTTERTEN  
KANINCHEN ZUM CHOLESTERINGEHALTE DES BLUTES.

Dass bei der Reiskrankheit, oder der B-Avitaminose, der Cholesteringehalt des Blutes eine Zunahme erfährt, haben, wie in der Einleitung gezeigt wurde, mehrere Forscher bereits dargelegt. Und wenn man an Kaninchen Cholesterinfütterung vornimmt, findet gleichzeitig mit einer Zunahme des Cholesteringehaltes im Blute ein Anwachsen des freien und gebundenen Cholesterins statt. Insbesondere ist das Verhältnis derselben bei den Blutkörperchen derartig, dass das gebundene Cholesterin hier deutlich vermehrt ist, wie in unserer ersten und zweiten Mitteilung bereits dargelegt wurde. Um nun die Frage zu beantworten, in welchem Verhältnis bei der Glykolyse des Blutes der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen das freie und das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen und im Blutplasma zu einander stehen, wurden die folgenden Untersuchungen vorgenommen, deren Ergebnisse ich nunmehr mitteilen werde.

*Experimentelle Ergebnisse.*

Wenn man den Verlauf der drei Fälle No. 16, 17 und 18 verfolgt, so ergibt sich das Folgende:

In der ersten Woche zeigt sich nur im Falle No. 18 eine Abschwächung der Glykolyse um 14%. Die Fälle No. 16 und No. 17 weisen keine Abschwächung auf. Wenn man nun zu dieser Zeit das Verteilungsverhältnis des freien und gebundenen Cholesterins zwischen den Blutkörperchen und dem Blutplasma betrachtet, so ist im Verhältnis zur Kontrolle das freie und gebundene Cholesterin in den einzelnen Fällen vermehrt um das 1,0- und 1,1-fache, das 0,9 und 3,4-fache, das 1,2- und 1,3-fache; das freie und gebundene Cholesterin im Blutplasma zeigt sich in den einzelnen Fällen als 1,2- und 2,0-fach, 0,7- und 0,5-fach; 1,0- und 1,2-fach; also weisen die Mengen des Cholesterins noch keine erheblichen Zunahmen auf; nur das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen nimmt beträchtlich zu; und wenn man das Verhältnis

Tabelle IV.

Fall 17,

Datum	Körper- gewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnah- me zul $\times 10^5$ Mill. in mg Erythro- zyten	Erythrozyten (mill)	Absch- wächung der Glyko- lyse in %	Cholesteringehalt in mg %			Choleste- rinester Gesamt- Choleste- rin	Bemerkungen
			Vor dem Ver- such	Nach 24 Std					Gesamt- Choleste- rin	freies Choleste- rin	Chole- sterin- ester	
2. IV.	2,650	86	764	449	301	45,8	6,880	Vollbut Blut- plasma Blut- körper- chen	156 94 234	94 31 167	62 63 67	Kontrolle 0,397 0,670 0,286
8. IV.	2,700	106	295	37	258	40,3	6,400		172 116 241	109 63 167	63 53 74	Seit 2. IV. Reismüt- terung 1. Woche 0,366 0,457 0,307
15. IV.	2,550	142	421	210	211	33,8	6,240	26,2	194 131 231	112 84 147	82 84 84	2. W. 0,433 0,359 0,364
22. IV.	2,370	119	322	172	150	25,0	6,000	44,3	146 94 206	78 31 132	68 63 74	3. W. 0,466 0,670 0,359
29. IV.	2,070	117	523	320	203	30,5	6,656	33,4	163 100 240	94 44 155	69 56 85	Seit 21. IV. Injektion von Lecithin 1. W. 0,423 0,560 0,354
5. V.	1,820	119	273	72	201	31,0	6,488	32,3	284 188 400	203 141 278	81 47 122	2. W. 0,285 0,250 0,305 Am 5. V. tot gefunden

Tabelle V.  
Fall 17.

Datum	Körper- gewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt		Zuckerabnah- me zu $1 \times 10^3$ Mill. Erythro- zyten	Erythrozyten (Mill.)	Absch- wächung der Glyko- lyse in %	Cholesteringehalt in mg %				Bemerkungen
			Vor dem 24 Ver- such	Nach 24 Std	in mg			Gesamt- chole- sterin	freies Chole- sterin	Chole- sterin- ester	Choleste- rin-Gesamt- cholesterin	
3. IV.	2,710	92	366	93	273	6,620		141 109 180	94 47 151	47 62 29	0,333 0,569 0,161	Kontrolle
9. IV.	2,800	122	354	72	282	6,448		141 63 235	78 31 136	63 32 99	0,447 0,508 0,421	Sitz 3. IV. Reisirü- tung 1. W.
16. IV.	2,450	125	271	46	225	6,400	14,3	155 125 193	94 47 151	62 78 42	0,603 0,624 0,219	2. W.
23. IV.	2,360	102	423	218	205	6,240	20,4	188 156 227	109 47 188	79 109 39	0,420 0,699 0,172	3. W.
30. IV.	2,050	101	462	299	163	6,000	34,0	219 153 296	147 78 130	72 78 166	0,329 0,500 0,561	Sitz 24. IV. Injek- tion von Lecithin 1. W.
6. V.	1,920	90	424	247	177	6,160	30,3	250 205 307	167 156 169	83 47 138	0,332 0,232 0,449	2. W. Am 10. V. tot gefunden

Tabelle V.  
Fall 18.

Datum	Körper- gewicht in kg	Blutzucker in mg %	Zuckergehalt in mg %		Zuckerabnah- me zu $1 \times 10^3$ Mill. Erythro- zyten	Erythrozyten (Mill.)	Absch- wächung der Glyko- lyse in %	Cholesteringehalt in mg %				Bemerkungen	
			Vor dem Ver- such	Nach 24 Stdn.				in mg Erythro- zyten	Gesamt- chole- sterin	freies Chole- sterin	Chole- sterin- ester		Choleste- rin
5. IV.	2,850	114	783	502	281	45,0	6,240	Vollbut- Blut- plasma Blut- körper- chen	125 94 184	78 31 133	47 63 48	0,376 0,670 0,261	Kontrolle
11. IV.	2,900	116	475	210	235	38,7	6,856		172 109 227	94 31 167	78 60	0,454 0,707 0,264	Seit 5. IV. Reinfüh- rung 1. W.
8. IV.	2,590	146	301	48	253	37,8	6,720	16,4	203 141 278	112 78 153	91 63 125	0,448 0,447 0,450	2. W.
25. IV.	2,370	124	413	239	174	27,2	6,400	39,6	159 125 200	94 31 171	65 94 29	0,409 0,750 0,145	3. W.
2. V.	2,200	104	495	331	164	27,3	6,000	39,3	188 125 234	109 78 122	79 47 142	0,420 0,376 0,538	Seit 26. IV. Injek- tion von Lecithin 1. W.
12. V.	1,950	116	572	395	177	27,6	6,240	38,7	219 188 257	156 106 129	63 82 128	0,288 0,436 0,500	2. W.

zwischen dem gebundenen und dem gesamten Cholesterin in den Blutkörperchen betrachtet, so stellt sich dieses Verhältnis in den Fällen 16 und 17 entschieden höher als in der Kontrolle. Im 18. Falle zeigt sich aber fast kein Unterschied; nur die Glykolyse ist beim Falle 18 etwas abgeschwächt.

Während der zweiten Woche beträgt in den einzelnen Fällen die Abschwächung der Glykolyse 26,2%, 14,3% und 16,4%; in dieser Zeit ist das freie oder gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen in den einzelnen Fällen 0,9- und 1,3-fach, 1,0- und 1,4-fach, sowie 1,1- und 2,6-fach. Das freie oder gebundene Cholesterin des Blutplasmas zeigt sich in den einzelnen Fällen zu 2,7- und 0,8-fach, 1,0- und 1,3-fach, 2,5- und 1,0-fach. In den Blutkörperchen nimmt also das gebundene Cholesterin mehr zu, im Blutplasma hingegen zeigt das freie Cholesterin die grössere Zunahme. Das Verhältnis zwischen dem gebundenen Cholesterin und dem Gesamtcholesterin ist in den Blutkörperchen in allen Fällen höher als bei der Kontrolle; im Blutplasma ist dieses Verhältnis im Falle No. 17 etwas höher, aber in den übrigen beiden Fällen ist es niedriger.

Die sich in der dritten Woche offenbarende Abschwächung der Glykolyse beträgt in den einzelnen Fällen: 44,3%, 20,4%, 39,6%; das freie und gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen ist 0,8- und 1,1-fach, 1,2- und 1,3-fach, sowie 1,3- und 0,6-fach gesteigert. Das freie oder gebundene Cholesterin des Blutplasmas hat sich in den einzelnen Fällen 1,0- und 1,0-fach, 1,0- und 1,7-fach, 1,0- und 1,5-fach vermehrt. Also nimmt das gebundene Cholesterin der Blutkörperchen nicht in dem gleichen Masse wie in der Vorwoche zu; jedoch zeigt das gebundene Cholesterin im Blutplasma eine ziemliche Zunahme. Die Verhältniszahl zwischen dem gebundenen und dem Gesamtcholesterin ist nur im Falle No. 18 klein, in den andern beiden Fällen ziemlich gross. Dieses Verhältnis beim Blutplasma zeigt sich beim Falle No. 16 gleich dem der Kontrolle, an den anderen beiden Fällen höher als in der Kontrolle. Mithin ist in der dritten Woche im Gegensatz zu der ersten und zweiten Woche die Zunahme des gebundenen Cholesterins in den Blutkörperchen nicht deutlich wahrnehmbar.

Aus den obigen Ergebnissen erhellt nun, dass während die Zunahme des Cholesterins im Blute von mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen ganz gering ist, und betreffs des Verteilungsverhältnisses zwischen dem gebundenen und dem freien Cholesterin in den Blutkörperchen und im Blutplasma in der ersten und zweiten Woche das gebundene Cholesterin mehr als das freie zunimmt, in der dritten Woche, obgleich die Glykolyse eine nach und nach zunehmende Abschwächung erfährt, das Verhältnis des gebundenen zu dem Gesamtcholesterin natürlich höher als bei der Kontrolle ausfällt, aber gegen die vorige Woche keine Steigerung zeigt. (Im Falle No. 18 zeigt sich dasselbe geringer als in der Kontrolle). Beim Blutplasma seinerseits ist die Verhältniszahl des gebundenen zu dem Gesamtcholesterin gering gewesen, während der dritten Woche hingegen gewachsen. Mithin lässt sich das Verhältnis zwischen der Abschwächung der Glykolyse und dem Verteilungsverhältnis des freien und gebundenen Cholesterins in den Blutkörperchen sowie in dem Blutplasma nicht mit einer einheitlichen Formel ausdrücken; nur ist die Verhältniszahl des gebundenen Cholesterins zum Gesamtcholesterin in den Blutkörperchen gross, und man kann also sagen, dass das gebundene Cholesterin hier etwas überwiegt.

#### IX. DER EINFLUSS DES LECITHINS AUF DIE GLYKOLYSE DER MIT POLIERTEM REIS GEFÜTTERTEN KANINCHEN.

Dass, wenn man Kaninchen mit Lecithin füttert, die Glykolyse des Blutes nicht abgeschwächt wird, wurde bereits in unsrer ersten Mitteilung dargelegt.

Und während die Hämoglykolyse bei solchen Kaninchen, welchen man polierten Reis zu fressen gab, abgeschwächt wird, und zugleich bei ihnen der Cholesteringehalt des Blutes zunimmt, zeigt das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen eine besonders hohe Neigung zur Vermehrung. In diesem Falle ist die Zunahme des Cholesterins nicht nur als eine Ursache der Abschwächung der Glykolyse des Blutes aufzufassen; aber indem Lecithin vom biologischen Standpunkte gegen Cholesterin sich antagonistisch

verhält, ist es von Interesse, zu erfahren, welchen Einfluss auf die durch Fütterung mit poliertem Reis abgeschwächte Hämoglykolyse das Lecithin ausüben wird. Von der Zeit an, wo die Glykolyse eine Abschwächung erfuhr, wurden daher täglich 10 ccm einer 0,5%igen Emulsion von Merck's Lecithin intravenös injiziert, und sodann der Verlauf beobachtet.

Wie sich aus der Tabelle IV ergibt, zeigt während der ersten Woche seit dem Beginn der Injektionen Fall 16, welcher vor der Injektion eine Abschwächung um 46,0% erfahren hatte, nunmehr nach der Injektion eine Abschwächung um 33,4%. In den anderen beiden Fällen aber zeigte auch während der zweiten und dritten Woche die Glykolyse keine Erholung. Wenn man den Cholesteringehalt nach der Injektion des Lecithins beobachtet, so zeigt während der ersten Woche das freie und gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen bei den einzelnen Fällen Zunahmen um das 0,9- und 1,3-, 0,9- und 5,7-, 0,9- und 2,3-fache; im Blutplasma bzw. das 1,4- und 0,9-fache, 1,7- und 1,3-fache, 2,5- und 0,7-fache. In dem Blutkörperchen nimmt also das gebundene Cholesterin stärker zu, im Blutplasma hingegen zeigt das freie Cholesterin eine höhere Zunahme. Mithin ist das Verhältnis zwischen dem gebundenen und dem Gesamtcholesterin in den verschiedenen Fällen, verglichen mit der Kontrolle, bei den Blutkörperchen höher, beim Blutplasma hingegen geringer.

In der zweiten Woche ist das freie und gebundene Cholesterin bei den Blutkörperchen in den einzelnen Fällen 1,7- und 1,8-fach, 1,1- und 4,8-fach, 0,9- und 2,7-fach; beim Blutplasma bzw. 4,5- und 1,5-fach, 3,3- und 0,8-fach, 3,4- und 1,3-fach: Also nimmt in den Blutkörperchen das gebundene Cholesterin zu; aber im Blutplasma zeigt das freie Cholesterin eine Zunahme. Mithin ist das Verhältnis zwischen dem gebundenen und dem Gesamtcholesterin bei den Blutkörperchen gross, beim Blutplasma aber klein.

Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, dass auch durch die Injektion von Lecithin keine Erholung von der durch Fütterung mit poliertem Reis herbeigeführten Abschwächung der Hämoglykolyse bei Kaninchen herbeigeführt wird. Dabei erfährt das Cholesterin im Blut eine gewisse Zunahme; und zwar nimmt in

den Blutkörperchen das gebundene Cholesterin besonders stark zu, während im Blutplasma das freie Cholesterin eine verhältnismässig hohe Zunahme aufweist.

Auf den aus Fütterung mit poliertem Reis resultierenden, im nüchternen Zustande vorhandenen gesteigerten Blutzucker hat die Injektion von Lecithin keinen Einfluss.

#### X. ZUSAMMENFASSENDE BEMERKUNGEN.

Um über die Frage, ob die Abschwächung der Hämoglykolyse bei mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen nicht allein auf die dabei erfolgende Schwächung der Körper der Kaninchen zurückzuführen sei, Klarheit zu gewinnen, hat der Verfasser an zur Kontrolle im Hungerzustande benutzten Kaninchen über den dabei vorhandenen Zustand der Hämoglykolyse vergleichende Experimente angestellt, und auf diese Weise die vorliegende Frage ohne weiteres geklärt. Dabei wird die entstandene Abschwächung der Hämoglykolyse durch Appetit fördernde Mittel wie Otimon, Insulin und Phosphatpufferlösung nicht wiederhergestellt. Dass nur bei Anwendung von Vitamin-B (Beriberol) eine verhältnismässig rasche Erholung herbeigeführt wird, ist so zu erklären, dass zwischen Vitamin-B und der Abschwächung der Hämoglykolyse ein bestimmter Kausalnexus als bestehend gedacht werden muss. Aber zu der Zeit der Anwendung bewirkt das Vitamin-B nur eine Erholung von der Abschwächung der Glykolyse; die Kaninchen wurden dabei allmählich schwächer und gingen schliesslich zugrunde. Das Vitamin-B besitzt nämlich nicht die Kraft, den Ernährungszustand der Kaninchen völlig wiederherzustellen. Der Grund hierfür liegt darin, dass, wie sich leicht denken lässt, bei der Fütterung mit poliertem Reis nicht nur das Vitamin, sondern ausserdem Eiweiss, Salze und andere Nährstoffe fehlen. Und es wird nun die Aufgabe künftiger weiterer experimenteller Forschungen sein festzustellen, welche Einflüsse die verschiedenen Verhältnisse auf die Glykolyse ausüben werden, wenn man die dem polierten Reis mangelnden Nährstoffe ersetzt, oder falls man nur an Vitamin-B mangelnde Nahrung verabfolgt, oder wenn andre Vitamine fehlen. Wie die Tabelle IV zeigt,

ist, wenn infolge der Fütterung mit poliertem Reis die Glykolyse im Blute abgeschwächt wird, eine gewisse Zunahme des Cholesterins im Blute vorhanden, indem insbesondere in den Blutkörperchen das gebundene Cholesterin erheblich zunimmt, im Blutplasma aber das freie Cholesterin eine Zunahme erfährt, was sich genau ebenso verhält, wie die Verhältnisse bei der Fütterung mit Cholesterin. Jedoch ist der Umfang und der Grad der Zunahme in beiden Fällen ganz verschieden. Und nicht nur dieser Unterschied besteht, sondern es lässt sich auch im Gegensatz zum Zustande bei der Fütterung mit Cholesterin zwischen der Abschwächung der Glykolyse und dem Grade der Zunahme des Cholesterins kein bestimmtes Verhältnis feststellen. Die schon in der ersten und zweiten Mitteilung dargelegte Abschwächung der Glykolyse bei Cholesterinfütterung zeigt keine Erholung nach der Injektion von Vitamin-B, geht allerdings nach Einführung von Lecithin relativ rasch auf ihren Normalwert zurück. Die bei Fütterung mit poliertem Reis entstandene Abschwächung der Glykolyse erfährt durch Lecithin keine günstige Beeinflussung.

Wie aus diesen experimentell gewonnenen Ergebnissen erhellt, ähneln sich die Erscheinungsweisen der durch Cholesterinfütterung, oder durch die Fütterung mit poliertem Reis hervorgerufenen Abschwächung der Hämoglykolyse; auch der jeweilige Grad dieser Abschwächung, und der Zustand der im Serum und in den Blutkörperchen auftretenden Abschwächung der Glykolyse usw. haben viele Ähnlichkeit mit einander. Aber betreffs des Mechanismus dieser Abschwächung der Glykolyse muss man sich doch wohl vorstellen, dass dabei Verschiedenheiten zwischen den Verhältnissen der Fütterung mit Cholesterin und der mit poliertem Reis obwalten.

Wenn ich nunmehr betreffs der kernhaltigen Erythrozyten in Hühnern die Meinungen der früheren Forscher mit den meinigen vergleiche, so hat, wie bereits vorher erwähnt wurde, Takemoto gesagt, die Abschwächung der Glykolyse erscheine vor der Steigerung des Blutzuckers, während Takayama im Gegensatze dazu behauptete, sie trete erst nachher in Erscheinung. Bei meinen Experimenten hat sich zwischen der Blutzucker-

steigerung und der Abschwächung der Glykolyse kein bestimmter zeitlicher Einklang feststellen lassen. In Betreff dieses Punktes verhält es sich einzig bei den Hühnern anders. Aber bereits ehe die Symptome der Reiskrankheit deutlich in Erscheinung treten, beginnt eine Abschwächung der Glykolyse (der Abschwächungsgrad ist bei den Kaninchen mehr oder weniger geringer als bei den Hühnern); dies und die Erscheinung, dass sich auf die Verabfolgung von Vitamin-B hin die Glykolyse erholt, sind Tatsachen, welche bei Hühnern wie Kaninchen in gleicher Weise auftreten. Und man kann sich auch denken, dass das Blut mit kernlosen Erythrozyten der Kaninchen bei der Fütterung mit poliertem Reis den gleichen Einfluss durch Fütterung mit poliertem Reis erleiden werde wie das kernhaltige Erythrozyten enthaltende Hühnerblut.

#### XI. SCHLUSSBEMERKUNG.

1. Die Hämoglykolyse wird bei Kaninchen im absoluten Hungerzustande nicht abgeschwächt. Nur wird zuweilen vor dem Tode eine ganz geringe Abschwächung um etwa 10% wahrgenommen.

2. Der Blutzucker in Kaninchen erfährt im Hungerzustande fast keine Änderung; nur vor dem Tode kommt eine geringe Steigerung desselben vor.

3. Die Lebensdauer der Kaninchen unter dem Einflusse des Hungers beträgt zwischen 13 und 25 Tagen, im Durchschnitt 18 Tage. Das Körpergewicht nimmt bei Kaninchen von umgerechnet 2,4 bis 2,8 kg im Durchschnitt um 37% ab.

4. Bei der Fütterung mit poliertem Reis zeigt die Hämoglykolyse der Kaninchen eine deutliche Abschwächung; diese Abschwächung beginnt von der zweiten Woche nach der Fütterung mit poliertem Reis und wird in der dritten Woche vollends deutlich. Der Grad derselben ist verglichen mit der Kontrolle 27,4%; indem er dann allmählich weiter zunimmt, ergibt sich schliesslich vor dem Tode eine durchschnittliche Abschwächung um 37,4%.

5. Die Abschwächung der Glykolyse findet sowohl in den Blutkörperchen als im Blutserum statt. Die im Serum auftre-

tende Abschwächung der Glykolyse ist geringer als die in den Blutkörperchen vor sich gehende. Besonders bemerkenswert ist dass, wo die Abschwächung der Glykolyse nicht deutlich ist, im Serum die Abschwächung sehr gering ausfällt oder gar nicht in die Erscheinung tritt.

6. Der Blutzucker im nüchternen Zustande erfährt in den meisten Fällen während der ersten und zweiten Woche eine Steigerung (nämlich in 66,7% der Fälle). Auch kommt es vor, dass auch noch nach der dritten Woche eine Steigerung des Blutzuckers sich einstellt, (nach der Häufigkeit in 16,7% der Fälle); es kommen aber auch Beispiele vor ohne Veränderung von Anfang bis zu Ende (Wieder 16,7% der Fälle). Zwischen der Zeit des Ercheinens der Abschwächung der Glykolyse und jener Steigerung des Blutzuckers lässt sich kein bestimmtes chronologisches Verhältnis feststellen.

7. Das Körpergewicht nimmt in der zweiten Woche um 9,40% ab. In der dritten Woche zeigt es eine Abnahme um 15,9%; und von da ab weiter allmählich abnehmend, weist es kurz vor dem Tode eine Abnahme um 26,6% auf.

8. Der Cholesteringehalt des Blutes nimmt ein wenig zu. Bei den Blutkörperchen nimmt das gebundene Cholesterin um einen etwas höheren Betrag zu; beim Blutplasma aber ist die Veränderung des freien und gebundenen Cholesterins nicht an eine bestimmte Regel gebunden. Daher kann man zwischen der Abschwächung der Glykolyse und der Menge des freien und gebundenen Cholesterins kein bestimmtes Verhältnis konstatieren; aber zur Zeit der Abschwächung der Glykolyse zeigt das gebundene Cholesterin in den Blutkörperchen eine Neigung zur Zunahme.

9. Nach den oben dargelegten Befunden zeigt sich zwischen der Erscheinung der bei Cholesterinfütterung auftretenden Abschwächungswirkung der Glykolyse einer-, und den bei Fütterung mit poliertem Reis sich ergebenden Erscheinungen anderseits eine Verschiedenheit der in Betracht kommenden Mechanismen.

10. Die abgeschwächte Glykolyse wird durch Injektion von Otimon, Insulin, Lecithin und Phosphatpufferlösung nicht zur Erholung gebracht. Aber bei der Injektion von Vitamin-B (Beri-

berol) tritt Erholung ein, jedoch verfallen die Kaninchen dennoch in Entkräftung und sterben. Der bei der Fütterung mit poliertem Reis im nüchternen Zustande gesteigerte Blutzucker wird durch die oben erwähnten Injektionsmittel so gut wie garnicht beeinflusst. Nur bei der Injektion von Vitamin-B und von Insulin kommt häufig eine unbedeutende Verminderung desselben vor.

Am Schlusse dieser Arbeit erfülle ich die angenehme Pflicht, den Herren Prof. Dr. Hatta und Prof. Dr. Kawashima für ihre sehr freundliche Anleitung bei der Anfertigung und für die gütige Durchsicht derselben, sowie auch dem Kaiserlichen Unterrichtsministerium für die mir zum Zweck der Ausführung dieser Untersuchungen gewährte finanzielle Unterstützung meinen ergebenen Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Asada, K. (1922): Biochem. Zeitschr., **142**, 44.  
Go, T. (1929): Mitteil. d. med. Gesellsch. zu Tokyo, **43**, 549.  
Homma, J. (1927): Nippon Naikagakkai Zasshi, **14**, Sonderabd.  
Kodama, E. (1925): Journ. of Biochem., **5**, 185.  
Kawashima, Y. (1924): Journ. of Biochem., **4**, 429.  
Kawashima, Y. u. Chiwaki, J. (1931): Journ. of Biochem., **13**, 107.  
Lawaczek (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **125**, 229.  
Nakae, R. (1930): Jika Zassi, No. 366, 1895.  
Ozawa, S. (1924): Iji Shinbun, No. 1143.  
Takemoto, H. (1927): The Japan. Journ. of Exper. Med., **11**, 143.  
Takayama, S. (1925): Chugai-Iji-Shimpo, No. 1078, 357.  
Yoshiki, K. (1929): Nippon Naikagakkai Zasshi, **16**, 886.



## KONSTITUTION DER POLYPEPTIDE UND PROTEOLYTISCHE FERMENTE.

VON

JUJIRO MATSUI.

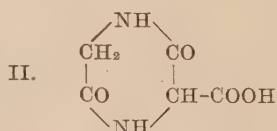
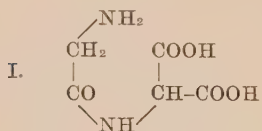
*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie  
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 13. Dezember 1932)

Im hiesigen Institut wurde schon unter Leitung von Prof. Akamatsu eine Reihe von Arbeiten über die Beziehung der Konstitution der Polypeptide zu ihrer proteolytischen Hydrolysierbarkeit ausgeführt. Ein besonderes Interesse wurde den Peptiden zugewandt, die als Baustein die Monoaminodicarbonsäure enthalten. Nakashima (1927) hat die Dipeptide aus der Asparaginsäure und dem Glycin untersucht und eine besonders leichte ereptische Aufspaltbarkeit des GlycyLasparagins gefunden. Dieses Dipeptid ist synthetisch besonders leicht zugänglich und dient nun als ein spezifisches Substrat für die Prüfung des Erepsins. Unter den Peptiden, die Miyanoki (1931) untersuchte, war das Asparagylhistidin vor allem bemerkenswert, weil dieses Dipeptid, abgesehen von der spezifischen Hydrolysierbarkeit durch das Erepsin, eine enorm starke exzitosekretorische Wirkung auf die Verdauungsdrüsen ausübt. Suzuki (1931) hat die Tripeptide, die 2 Moleküle Glycin und ein Molekül der Asparaginsäure in allen möglichen Bindungsreihen enthalten, dargestellt und ihre ausschliessliche ereptische Aufspaltbarkeit bestätigt. Ein wertvoller Befund wurde aber von ihm an dem AsparagylDityrosin gemacht. Dieses Tripeptid war durch das Trypsin, und zwar ausschliesslich durch das mit der Enterokinase aktivierte Trypsin, spaltbar, aber gar nicht durch andere Arten Proteasen. Somit gelang zum ersten Mal die Synthese des spezifischen Substrats für das aktivierte Trypsin. In seiner vorigen Mitteilung hat der Verfasser (1933) über das AsparagylDglycyltyrosin berichtet, welches auch spezifisch durch das aktivierte Trypsin hydrolysiert

wurde. Man sieht, dass das Binden von 2 Molekülen Glycyltyrosin an beiden Carboxylgruppen der Asparaginsäure die ursprüngliche ereptische Spaltbarkeit des Glycyltyrosinrests verschwinden liess und das neue und wichtige fermentative Verhalten des entstandenen Pentapeptids herbeiführte.

Die interessante Rolle, die die Monoaminodicarbonsäure als Polypeptidbestandteil spielt, in Betracht ziehend, wollte der Verfasser die Glycylaminomalonsäure herstellen. Die Chloracetylaminomalonsäure, die durch die Verseifung ihres Esters kristallinisch zu bekommen war, wurde in üblicher Weise mit konzentriertem Ammoniak aminiert, und nach dem Entfernen des Chlors und Ammoniums wurde das gesuchte Produkt mit Alkohol gefällt. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab aber, dass ihr N-Gehalt grösser als die berechnete Zahl für die Glycylaminomalonsäure(I) war. Die Diketopiperazinreaktion mittels Pikrinsäure-Carbonat war positiv. Ich nahm an, dass die primär entstandene Glycylaminomalonsäure während des Verfahrens zu ihrer Isolierung in fester Form irgendwo in die Anhydridform überginge und endlich als ihr Anhydrid, die Diketopiperazincarbonsäure(II), erhalten würde. Die ausgeführte C- und H-Bestimmung sprach für das Glycylaminomalonsäureanhydrid und dafür auch die früher gefundene Kjeldahl-N-Zahl.



Nun wurde die Wirkung der Proteasen auf diese Substanz untersucht. Man kennt bisher keine auf die Hydrolyse von Diketopiperazin eingestellten Fermente. Es war nun sehr überraschend, dass die Experimente ergaben, dass die Diketopiperazincarbonsäure durch das Trypsin und noch energischer durch das aktivierte Trypsin gespalten werden konnte. Pepsin und Erepsin waren unwirksam. Die fermentative Aufschliessung des Diketopiperazinrings wurde somit zum ersten Mal festgestellt. Die

tryptische Spaltung von Diketopiperazin wurde weiter im hiesigen Institut an dem Glycylasparaginsäureanhydrid, Glycylglutaminsäureanhydrid und Asparagylasparaginsäureanhydrid bewiesen. Die Ergebnisse sollen von Ishiyama mitgeteilt werden. Wir glauben, dass unser Experiment über die Spaltung von Diketopiperazin ein neues Licht auf die Fermentlehre wirft und sicher einen grossen Beitrag zum Fortschritt der Chemie der Eiweisskonstitution liefert.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

##### *I. Darstellung des Glycylaminomalonsäureanhydrids.*

Aminomalonsäureäthylester wurde nach der Angabe von Locquin und Cerechez (1928) durch Reduktion des Isonitrosomalonsäureäthylesters mittels Aluminiumamalgams hergestellt. Das Reaktionsprodukt wurde unter vermindertem Druck fraktioniert. Der Siedepunkt des Esters war 116–118°C bei 12 mm Hg. 9.2 g Ester wurden in 100 ccm Äther gelöst und unter starkem Kühlen mit 3 g Chloracetylchlorid in 30 ccm Äther versetzt. Dann wurden unter Schütteln und Kühlen 3 g Chloracetylchlorid in 30 ccm Äther und 57 ccm 10%iger Carbonatlösung in Portionen abwechselnd zugefügt. Die ätherische Schicht wurde abgehoben und unter vermindertem Druck eingedampft. Beim Abkühlen schied sich der Chloracetylaminomalonester als nadelförmige Kristalle ab. Schmelzpunkt 98°C. Ausbeute 9.9 g.

Analyse: (Bei 78°C unter 16 mm Druck über  $P_2O_5$  getrocknet.)

0.53309 g Substanz lieferten 0.02930 g Kjeldahl-N.

Für  $C_9H_{14}N_1O_5Cl_1$  (251.58) berechnet 5.57%N,  
gefunden 5.50%N.

Zur Verseifung des Esters wurden 9.2 g Chloracetylaminomalonester bei Zimmertemperatur in n-NaOH (2.5 Mol) gelöst, nach 1 Stunde mit gleicher Menge n-HCl versetzt und die Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Der Ätherauszug des Rückstandes wurde weiter im Vakuum zum Sirup eingedampft. Bei 0°C schied sich die Chloracetylaminomalonsäure als Blättchen ab. Sie schmolz bei 113°C. Ausbeute 6.5 g.

Analyse: (Bei 100°C unter 16 mm Druck über  $P_2O_5$  getrocknet.)

0.23804 g Substanz lieferten 0.01695 Kjeldahl-N.

Für  $C_5H_6N_1O_5Cl_1$  (195.516) berechnet 7.16%N,  
gefunden 7.12%N.

5.6 g Chloracetylaminomalonsäure wurden in 56 ccm konzentriertem Ammoniak gelöst und bei Zimmertemperatur 4 Tage stehen gelassen. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingedampft und, um das gebundene Ammoniak zu entfernen, mit 196 ccm 5%iger Barytlösung versetzt und wieder bis zu 1/3–1/4 Volumen konzentriert. Das Verdünnen mit Wasser und das Eindampfen der Lösung wurden wiederholt, bis kein Ammoniak im Destillat mehr nachzuweisen war. Die Lösung wurde dann verdünnt, mit Schwefelsäure gegen Kongo neutralisiert und mit 6.3 g Silbersulfat geschüttelt. Aus dem Filtrat wurden das Silber mittels  $H_2S$ , dieser mittels Durchlüftung und dann die Schwefelsäure mittels Baryt entfernt. Man dampfte das Filtrat bei 45°C unter vermindertem Druck ein und fällte die Substanz mit Alkohol. Ein Erhalten der Substanz in kristallinischer Form wurde vergeblich angestrebt. Schmelzpunkt 193°C. Pikrinsäure-Carbonatreaktion positiv.

Analyse: (Bei 100°C unter 16 mm Druck über  $P_2O_5$  getrocknet.)

0.27544 g Substanz lieferten 0.04848 g Kjeldahl-N.

0.14600 g Substanz lieferten 0.20340 g  $CO_2$  und 0.04819 g  $H_2O$ .

Für  $C_5H_8O_5N_2$  (176.08) berechnet 15.92%N, 34.08%C, 4.58%H,

für  $C_5H_6O_4N_2$  (158.064) berechnet 17.72%N, 37.96%C, 3.83%H,

gefunden 17.60%N, 38.00%C, 3.70%H.

Die erhaltene Substanz war als Glycylaminomalonsäureanhydrid anzunehmen.

## II. Fermentlösungen.

Es wurden dieselben Fermentlösungen wie in der vorigen Mitteilung (1933) gebraucht. Das Erepsin war stark wirksam auf das Glycylasparagin und die Glycylglutaminsäure.

## III. Versuchsanordnung.

Versuchstemperatur 37°C PH-Bestimmung elektrometrisch

gleich nach der Anstellung der Versuche. Titration nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz(1921) mit alkoholischer Kalilauge.

#### IV. Ergebnisse.

##### A. Pepsin.

Substrat	0.3075 g	} $P_H$ 1.90
Wasser	15 ccm	
M/10 Glykokoll-HCl-Puffer (5:5)	5 ccm	
2% Pepsin (Grübler)	5 ccm	
Kein COOH-Zuwachs nach 48 Stunden.		

##### B. Erepsin.

Substrat	0.23903 g	} $P_H$ 7.88
Wasser	15 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5 : 9.5)	5 ccm	
Erepsin	5 ccm	

##### C. Trypsin (nicht aktiviert).

Substrat	0.19756 g	} $P_H$ 7.90
Wasser	15 ccm	
M/10 Phosphatpuffer(0.5:9.5)	6 ccm	
Trypsin	9 ccm	

Zeit in Stunden	4	24	48
n/5 KOH Zuwachs in ccm	0.11	0.17	0.22
Hydrolysendegrad	10.6%	16.2%	21.2%

##### D. Trypsin + Enterokinase.

Substrat	0.25034 g	} $P_H$ 7.85
Wasser	15 ccm	
M/10 Phosphatpuffer(0.5:9.5)	6 ccm	
Trypsin + Kinaselösung	9 ccm	

Zeit in Stunden	4	24	48
n/5 KOH Zuwachs in ccm	0.34	0.48	0.72
Hydrolysengrad	25.8%	36.4%	54.5%

## LITERATUR.

Loequin, R. u. Cerechez, V. (1928): Compt. rend., **20**, 1360.

Matsui, J. (1933): J. of Biochem., **17**, 163.

Miyanoki, Y. (1931): J. of Biochem., **13**, 411.

Nakashima, R. (1927): J. of Biochem., **7**, 399.

Suzuki, K. (1931): J. of Biochem., **13**, 74.

Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E. (1921): Ber. d. Deutsch.  
Chem. Ges., **54**, 2988.

## VORBEMERKUNG ZU DURCHBLUTUNGS- VERSUCHEN DES MAGEN.

VON

*Prof. Dr. M. TSUDJI.*

*(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)*

(Eingegangen am 15. Dezember 1932)

Im tierischen sowie im menschlichen reinen Magensaft wurden die verschiedenen Substanzen in unserem Laboratrium in quantitativer Weise genau untersucht. Namentlich wurden Harnstoff, Ammoniak und Aminosäure (von Inoue 1929, Sumida und Hongo 1930), Allantoin und Harnsäure (von Inatsugu 1930), Kreatin und Kreatinin (von Hongo und Ide 1932), Milchsäure (von Matsuoka 1930) und Acetonkörper (von Ikebe 1931) als normale Bestandteile des Magensaftes angegeben. Nach Steinitz (1927) gehen die Reststickstoffwerte im Magensaft und im Blute unter normalen Verhältnissen parallel, und bei Erhöhung ihrer Werte im Blute infolge von Niereninsuffizienz steigen die Werte im Magensaft entsprechend; aber bei hochgradiger Niereninsuffizienz steigt der Reststickstoff im Magensaft erheblich über denjenigen des Blutes, so dass man berechtigt sein wird, eine aktive Tätigkeit der Magendrüsenzellen anzunehmen und von einer vikariierenden Stickstoffausscheidung zu sprechen. Andererseits ist schon berichtet worden, dass verschiedene parenteral injizierte Präparate wie Traubenzucker, Salicylsäure und Jodid (Ascher 1924, Lipschitz 1926) und verschiedene Farbstoffe (Kobayashi 1926) in den Magen ausgeschieden werden. In unserer Klinik ist auch beobachtet worden, dass experimentell Tieren in die Blutbahn injizierte oder infundierte Substanzen sich teilweise im Magensaft wieder nachweisen lassen, wovon bald die Rede sein wird. Aber nach unseren systematischen Untersuchungen sind wir zu der Auffassung gelangt, dass die Substanzen im Magensaft, welche normalerweise von uns gefunden wurden, nicht alle direkt aus dem Blute allein dahin transportiert werden, sondern zum grossen Teil durch

chemischen Umsatz in der Magenwandung bei deren sekretorischer Tätigkeit produziert und in den Magen mit dem Sekret zusammen ausgeschieden werden.

Wenn diese Auffassung richtig ist, so muss man einen bestimmten Chemismus der Magenwandung annehmen, welcher uns bisher ganz entgangen ist. Um diesen Chemismus klar zu stellen, wollen wir Durchblutungsversuche des Magens mit verschiedenen Substanzen, welche konstitutionell festgestellt sind, unternehmen. Durchblutungsversuche des Magens sind bisher von niemand ausgeführt worden.

#### LITERATUR.

- Ascher, O. (1924): Med. Klinik, **20**, 752.  
Hongo, Y. u. Ide, H. (1932): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 853.  
Ikebe, K. (1931): Nagasaki Igakkai Zassi, **9**, 1025.  
Inatsugu, Y. (1931): Journal of Biochemistry, **13**, 1.  
Inoue, K. (1925): Nagasaki Igakkai Zassi, **7**, 984.  
Kobayashi, K. (1928): Journ. of Gastroenterology, **3**, 25.  
Lipschitz, W. (1926): Kl. Wochenschr., **5**, 2008.  
Matsuoka, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 963.  
Steinitz, H. (1927/28): Kl. Wochenschr., **6**, 949; **7**, 1267.  
Sumida, S. u. Hongo, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 918.

## DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji)

### I. Mitteilung.

#### Durchblutung des Magens mit Histamin.

VON

Y. YOSHIDA

(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 15. Dezember 1932)

Der reine Magensaft des Kleinmagenhundes hat eine befördernde Wirkung auf die Magensaftsekretion, wenn er wieder demselben Hunde oder anderen Hunden intravenös injiziert wird (Frouin 1905, Yoshida 1931). Nach pharmakologischen Untersuchungen von mir zeigt der Magensaft, der durch Scheinfütterung gewonnen wurde, keine Wirkung auf Atemtypus, Blutdruck, sowie auf glattemuskulige Organpräparate des Kaninchens. Der durch Fleischfütterung gewonnene Magensaft verstärkt zuweilen die Pendelbewegung und den Tonus der Darmschlingenpräparate. Dagegen ist der durch Histamininjektion gewonnene Magensaft in ausgezeichneter Weise wirksam, indem er auf Atemtypus, Blutdruck, sowie auf Uterus- und Darmpräparate ganz gleich wie Histamin einwirkt. Also sind die wirksamen Substanzen im Magensaft von einander verschieden je nach der Art der Erreger, welches die Sezernierung des Magensaftes veranlassen, und die wirksame Substanz im durch Histamininjektion gewonnenen Magensaftes muss nach ihrer Wirkungsweise höchst wahrscheinlich Histamin oder eine histaminähnliche Substanz sein. Verschiedene Farbstoffe, parenteral dargereicht, werden mit dem Magensekret in den Magen ausgeschieden (Kobayashi 1927). Stoffwechselprodukte der Magendrüsen befinden sich auch im Magensaftes (Inoue 1929, Sumida und Hongo 1930). Da allgemein angenommen wird, dass das Histamin für die Magensekretion peripherisch im Magen selbst wirkt, kann man also ohne Zwang vermuten, dass das Histamin, welches zu der Magenschleimhaut

gelangt ist, teilweise im Magen mit dem Magensaft ausscheiden mag. Um diese Vermutung nachzuprüfen ist es nötig, das Histamin aus dem Magensaft, der aus der Kleinmagenfistel infolge von Histamininjektion sezerniert wurde, analytisch rein zu isolieren. Aber dies wird kaum möglich sein, weil die injizierte Menge des Histamins gewöhnlich ganz gering, nämlich nur 1–2 mg ist. Um diesen Zweck trotzdem zu erreichen, sind Durchblutungsversuche des Magens mit Histamin, wobei man die dazu nötige Menge von Histamin nehmen kann, sehr geeignet.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zu den Experimenten wurde der Nüchternmagen des Hundes gebraucht. Von der Art. Carotis Ext. des Hundes wurde 250–300 ccm Blut entnommen, defibriniert und mit Tuch coliert. Dann wurde der Bauch des Hundes geöffnet. Der Magen wurde am Oesophagusende und im Duodenum an einer vom Pylorus 2–3 cm entfernten Stelle mit Klemmer fest gefasst, und dort wurde durchgeschnitten. Die Gefässäste, die zu der Magenversorgung keine Beziehung haben, wurden alle unterbunden und durchschnitten. Dann wurde der Magen mit einem Teile der Bauchaorta in der Gegend der Verzweigung der Art. coeliaca und des Pancreakopfes und mit der Pfortader zusammen herausgeschnitten und in eine flache Schale gebracht. Eine Kanüle wurde sofort in die Art. coeliaca, deren Ausmündung von der Innenfläche der Aorta aus ganz leicht aufzusuchen ist, und eine andere in die Pfortader eingeführt. Von der arteriellen Kanüle aus wurde Ringersche Lösung eingespritzt, um die Magenwandung auszuwaschen, da sonst die Durchblutung infolge von Blutkoagulierung nicht glatt von statten geht. Dabei floss die Lösung aus den noch nicht unterbundenen Gefässen, u. zw. aus Art. duodenopancreatica, Art. hepatica und anderen kleinen Gefässen aus. Diese Gefässe wurden sofort unterbunden.

Nach der Auswaschung wurde der Magen wieder mit defibriertem Blut durchströmt. Auf diese Weise liess sich sehr bequem die Blutung aus den Kapillaren stillen. Der so vorbereitete Magen wurde in Ringersche Lösung eingetaucht, welche auf 38°C

Wärme gehalten war. Die Durchblutung wurde nach Mizuki-Nakagawa ausgeführt. Mit der Durchblutung gerät der Magen immer sofort in lebhafte peristaltische Bewegung, welche im allgemeinen 1 Stunde andauert. Bei Zusatz von Histaminchlorhydrat zu dem Blute verstärkt sich die Bewegung sehr ausgeprägt und dauert ungefähr 3 Stunden. Also wurde der Magen im Versuche über 3 Stunden lang durchblutet, da der Magen biologisch so lange tätig sein dürfte. Die Durchblutung geschah streng unter 25 mm Hg-säure-Druck. Unter höherem Druck wird sonst in der Magenschleimhaut sowie in der serösen Haut sehr oft Blutung beobachtet. Wenn der Mageninhalt blutig verfärbt war, wurde die Untersuchung des Magensaftes eingestellt. Am Ende der Durchblutung wurde der Magen mit Physiologischer Kochsalzlösung durchströmt, bis das Spülwasser fast klar wurde. Das Spülwasser wurde dann mit dem Blut vereinigt, und Blut, Magenschleimhaut und Magensaft wurden auf Histamin untersucht.

#### *Blut.*

Das Blut wurde nach Zusatz von 95%igem Alkohol einen Tag stehen gelassen und abgesaugt. Der Rückstand wurde in Reibeschale unter Zusatz von Alkohol zerrieben und filtriert. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt. Jedes Filtrat wurde in einen Destillationskolben gesammelt und abdestilliert. Der Rückstand wurde wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen, umgerührt und filtriert. Das Filtrat wurde abgedämpft. Der Rückstand wurde mit einer kleinen Menge von 5%iger Schwefelsäurelösung versetzt und filtriert. Das Histamin im Filtrat wurde mit 20%iger Phosphorwolframsäurelösung gefällt, und die Flüssigkeit abgesaugt. Das Histaminwolframat wurde mit Baryt zerlegt und filtriert. Überschüssiges Baryt wurde mit CO<sub>2</sub> entfernt. Das Filtrat wurde eingeeengt, mit alkoholischer Lösung von Pikrinsäure versetzt und stehen gelassen. Das auskristallisierte Histaminpikrat wurde getrocknet und gewogen.

#### *Magenschleimhaut.*

Die Magenschleimhaut wurde mit dem Messer von der Muskel-

schicht abgeschabt, mit der Schere zerkleinert und dann mit Alkohol erschöpfend extrahiert. Das Filtrat wurde wie das Blut behandelt.

### *Magensaft.*

Der Magensaft wurde wie das Blut behandelt.

#### Durchblutungsversuche des Magens mit Histaminohlorhydrat.

Dat.	Vers. Nr.	Blutmenge	Histamin-chlorhydrat	Als Histaminpikrat zurückgewonnenes Histamin			Menge d. Magensafts.
				im Blut	in der Schleimhaut	im Mageninhalt	
13/IX	1.	200	0.35	0.1226	—	0.0324	8.0
18/IX	2.	200	0.5	0.0429	—	0.0112	26.0
23/I	3.	250	0.5	0.1261	0.0682	0.0176	22.0
20/II	4.	250	1.0	0.4477	0.0435	0.0262	25.0
6/III	5.	250	1.0	0.3354	0.0882	0.0328	17.0
4/V	6.	250	1.0	0.2458	0.0998	0.0551	18.0

Zur Identifizierung wurde der Schmelzpunkt der Kristalle bestimmt. Die Substanz schmolz bei 232°C. Ausserdem wurde das Histaminpikrat, welches von dem Mageninhalt gewonnen wurde, in Histaminplatinat übergeführt und dann mit der Substanz die Platinbestimmung gemacht. Das von dem Mageninhalt gewonnene Histaminpikrat wurde nämlich in heissem Wasser gelöst und unter saurer Reaktion mit Schwefelsäure mit Äther geschüttelt. Die von Pikrinsäure befreite Lösung wurde mit Baryt versetzt und filtriert. Überschüssiges Baryt wurde mit CO<sub>2</sub> behandelt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockenheit abgedampft, in wenigem Wasser gelöst und mit alkoholischer Lösung von Platinchlorid versetzt. Dann wurde wieder eine kleine Menge Alkohol zugegossen und das Ganz stehen gelassen. Das auskristallisierte Histaminchlorplatinat wurde getrocknet und die Platinbestimmung ausgeführt.

Platinbestimmung von Histaminchlorplatinat (aus dem Mageninhalt):

1. Versuch No. 1 diente zur Prüfung  
Substanz 0.017 g gaben 0.0040 Platin  
Platin 37.3%  
Berechnet für  $(C_5H_9N_3) H_2Pt Cl_6$   
Platin 37.4%

2. Versuch No. 3 diente zur Prüfung. Da die rein gewonnene Substanz zu wenig war, wurde sie mit der in demselben Versuche aus dem Blut gewonnenen Substanz mischgeprüft.

Substanz 0.1004 g gaben 0.0376 g Platin  
Platin 37.25%

In den Durchblutungsversuchen blieb das Histamin, welches dem Blut zugesetzt wurde, zum grossen Teil im Blute zurück. Aber zum kleinen Teil wurde das Histamin in der Magenschleimhaut sowie im Magensaft vorgefunden. Das Histamin in der Magenschleimhaut und im Magensaft stammt nicht direkt von dem im Blut zurückgebliebenen Histamin selbst, weil die Magenschleimhaut nach Ende der Durchblutung mit physiologischer Kochsalzlösung gut gewaschen wurde, und der Magensaft, welcher zur Untersuchung genommen wurde, meistens keine blutige Farbe, manchmal nur spärliche Rötung zeigte. Bezüglich des Mechanismus, durch den das Histamin im Blute in die Magenschleimhaut übergeht und sich im Magensaft vorfindet, lässt sich aus diesem Experimente nichts weiter schliessen. Nicht wenig interessierte es uns aber, dass die Tatsache, dass das Histamin im Blut in den Magen ausscheidet, mit der Tatsache gut übereinstimmt, dass der durch Histamininjektion gewonnene Magensaft des Kleinhirnhundes eine histaminähnliche Wirkung zeigte.

#### SCHLÜSSE.

Wenn man isolierten Hundemagen mit Histamin eine gewisse Zeitlang durchströmt, findet sich das Histamin nicht nur im Blut zurückbleibend, sondern teilweise auch in der Schleimhaut sowie im Magensaft.

#### LITERATUR.

Frouin, M. A. (1905): Cpt. rend. de la société de biologie, 58, 887.

- Inoue, K. (1929): Nagasaki Igakkai Zassi, **7**, 984.  
Kobayashi, K. (1927): Journal of Gastroenterology, **2**, 181.  
Sumida, S. u. Hongo, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 981.  
Yoshida, Y.: Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 868.

## DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji)

### II. Mitteilung.

#### Durchblutung des Magens mit dl-Alanin und d-Alanin.

VON

Y. MATSUOKA.

(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 15. Dezember 1932)

Verschiedene Aminosäuren erregen die Magensaftsekretion sehr lebhaft (1930). Aber in welcher Weise dabei diese Substanzen auf den Organismus einwirken, ist uns nicht bekannt. Die Basen, wie Histamin und Cholin, welche starke Erreger für die Magensaftsekretion sind, wirken nach verschiedenen Autoren peripherisch im Magen selbst. Wenn der Angriffspunkt der Aminosäure in bezug auf die Magensaftsekretion in der Magenwand selbst angenommen wird, werden die Substanzen höchst wahrscheinlich im Momente ihrer Einwirkung, durch welche Salzsäurebildung hervorgerufen und die Sekretion von Magensaft befördert wird, irgend einer chemischen Veränderung ausgesetzt. Alanin wird in der Leber abgebaut, um Milchsäure zu bilden (V. Noorden und Embden, 1906; Embden, Salmon und Schmidt, 1906). Aber die Leber ist nicht das einzige Organ der  $\text{NH}_2$ -Abspaltung aus den Aminosäuren. Salaskin (1898), Horodinski, Salaskin und Zaleski (1902) haben gezeigt, dass das Venenblut regelmässig reicher an Ammoniak ist als das Arterienblut, was auf einen Abbau der Aminosäuren in verschiedenen Körperbezirken hinweist. Besonders gross fanden sie den  $\text{NH}_3$ -Gehalt des Pfortaderblutes; das spricht dafür, dass besonders in der Darmschleimhaut eine erhebliche Desaminierung stattfindet. O. Cohnheim (1909) hat bei Fischen ebenfalls eine  $\text{NH}_2$ -Abspaltung in der Darmschleimhaut nachgewiesen. In analoger Weise mögen also die Aminosäuren, welche die Magensaftsekretion stark befördern, in der

Magenwand abgebaut werden. Um einen Umriss der chemischen Vorgänge in der Magenwand zu gewinnen, die uns bisher sehr wenig bekannt sind, habe ich Durchblutungsversuche des Magens mit *dl*-Alanin und *d*-Alanin unternommen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Experimente wurde der Magen des Hundes gebraucht. Von der Art. carotis externa des Hundes wurde Blut 200–300 ccm entnommen, defibriniert und dann mit Tuch koliert. Das so bereitete Blut mit Alanin wurde in die Art. coeliaca desselben Hundes eingeströmt und aus der V. Pfortae ausgeströmt. Natürlich wurden vorher die Aeste, welche zu der Magenversorgung keine Beziehung haben, unterbunden und durchschnitten. Die Durchblutung wurde nach Mizuki-Nakagawa in einem Gefässe ausgeführt, das 38°C warme Ringersche Lösung enthielt. Jede Durchblutung dauerte über 3 Stunden. Die Durchblutung geschah immer unter 25 mm Hg-Säuledruck; denn unter höherem Druck wird in der Magenschleimhaut sehr oft Blutung beobachtet. Nach der Durchblutung wurden Blut und Mageninhalt auf zurückgebliebenes Alanin und Milchsäure untersucht.

#### I.

Ich isolierte das Alanin aus dem Blut durch die Estermethode und rechnete die Menge des Alanins durch N-Bestimmung um, wodurch die Menge des verlorenen Alanins ungefähr abgeschätzt werden kann. Die Identifizierung des Alanins geschah durch Cu-Bestimmung aus dem Kupfersalz. Die Milchsäure wurde nach Tanaka und Endo's Methode bestimmt.

Das aus dem Magensaft gewonnene Alanin wurde gereinigt, und in das Kupfersalz gebracht. Es betrug 0,0112 g. Das Kupfersalz wurde mit reinem Alanin-Kupfer vermischt und analysiert. Substanz 0,1124 g (Alanin-Cu 0,0112 + rein Alanin-Cu) lieferten 0,0374 g CuO.

Berech. für $(C_3H_6O_2)_2Cu$ ;	26,52% Cu
Gef.	26,51% Cu

TABELLE.

Durchblutungs Versuche des Magens mit 2.0 g dl-Alanin und d-Alanin.

Dat.	Vers. Nr.	Blut				Magensaft			Verlor. Alanin g	Bemerk. durch- strömt
		Milchsäure mg %			Alanin g	Menge	Milchsäure mg %	Alanin g		
		Vor	nach	Diff.						
21/XI	1.	11.2	31.2	20.0	0.056	—	—	—	—	Blut u. dl-Alanin
22/XI	2.	18.2	41.4	23.2	0.180	15	55.9	0.140	1.68	„
28/XII	3.	29.7	48.7	19.0	0.445	20	22.8	0.178	1.377	„
2/II	4.	19.9	44.3	25.4	—	—	—	—	—	Blut u. d-Alanin
Durchschnitt 21.9										
20/11	5.	0	6.3	6.3	—	13	7.3	—	—	Ringers Lös. u. dl-Alanin

Kontrollversuche bezüglich der Milchsäure im Blute.

Dat.	Vers. Nr.	Milchsäure im Blute mg %			Bemerk.
		Vor	nach	Diff.	
28/XI	1.	29.7	32.7	3.0	Blut stand im Brutschrank bei 38°C
32/III	2.	9.1	10.4	1.3	
Durchschnitt				2.2	
5/II	1.	22.1	25.6	3.5	Magen wurde ohne Alanin durchströmt.
12/III	2.	21.3	25.4	4.1	
Durchschnitt				3.8	

*dl*-Alanin und *d*-Alanin wurden in der Magenwand teilweiser Zersetzung ausgesetzt, wobei Milchsäure gebildet wurde. Auch in Kontrollversuchen mit blossen Blut ohne Alanin vermehrte sich die Milchsäure des Blutes, aber die Menge war viel geringer als die der Milchsäure in den Hauptversuchen, wie man auf der Tabelle sieht. Die vermehrte Milchsäure betrug nämlich durchschnittlich 3,8 mg% im Blute, welches ohne Alanin 3 Stunden durch die Magenwand geströmt wurde, und 2,2 mg% im Blute, welches eben so lang im Brutkasten stand, wogegen die vermehrte Milchsäure im Blute vom Hauptversuche im Durchschnitte als 21,9 mg% gefunden wurde. Die Milchsäure wurde nicht nur im Blute, sondern auch in dem Magensaft gefunden, welcher während der Durchblutung im Magen sich sezernierte. Auch in einem Durchblutungsversuche, wo das *dl*-Alanin mit Ringer's Lösung versetzt wurde, fand sich die Milchsäure im Blut sowie im Mageninhalte vor, wenn auch die Menge ganz gering war. Aus diesem Ergebnisse ist ersichtlich, dass die Milchsäure aus Alanin in der Magenwand gebildet wurde und bei der Sekretion mit dem Sekret zusammen teilweise in den Magen ausschied. Vor kurzem habe ich durch quantitative Bestimmung gezeigt, dass die Milchsäure im menschlichen sowie im tierischen reinen Magensaft als ein normaler Bestandteil immer vorkommt (1930). Die beiden Resultate stimmen miteinander gut überein. Im Magensaft fand ich nicht nur die neugebildete Milchsäure sondern auch das Alanin, welches in durchbluteten Medium mit enthalten war. Die Tatsache stimmt auch mit den Befunden bei den Versuchen mit Histamin nach Yoshida gut überein, wo der Magensaft, welcher durch subkutane Injektion mit Histaminchlorhydrat aus der Kleinmagenfistel des Hundes ausfloss, histaminähnliche Wirkungen zeigte, und das Histamin welches beim Durchblutungsversuche des Magens dem durchröhmten Blute zugesetzt war, sich teilweise im Magensaft vorfand.

## II.

### *Versuch I.*

#### *Blut.*

Wenn die Milchsäure wirklich unter Verbrauch des *d*-Alanins

entwickelt wird, muss man der Magenwand ein oxydatives Desaminierungsvermögen zuschreiben, und muss die neugebildete Milchsäure optisch aktiv sein. Dies musste bestätigt werden. Um die Milchsäure möglichst rein zu isolieren, wurde das durchgeströmte Blut, welches vorher 1 g *d*-Alanin (Merk) enthielt, mit 94%igem Alkohol bis zu 10-fachem Volumen versetzt. Nach 24 Stunden wurde es abfiltriert, und der Rückstand mit Alkohol wiederholt ausgewaschen. Nach Abdestillieren des Alkohols wurde der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt, einige Stunden stehen gelassen und filtriert. Der Alkohol wurde verdunstet. Der Rückstand wurde mit wenigem Wasser aufgenommen und unter sodaalkoholischer Reaktion mit Äther 48 Stunden extrahiert, um die Fette zu beseitigen. Die fettfreie wässrige Lösung wurde mit Phosphorsäure stark angesäuert und wieder mit Äther 72 Stunden erschöpfend extrahiert. Der Ätherextrakt wurde mit Na-Sulfat von Wasser befreit, filtriert und verdunstet. Der Rückstand wurde mit wenigem Wasser aufgenommen, mit Bleicarbonat versetzt, auf dem Wasserbade  $\frac{1}{2}$  Stunde erwärmt, und filtriert. Das Filtrat wurde mit  $\text{SH}_2$  behandelt, um das überschüssige Blei zu entfernen. Das Filtrat wurde eingengt und mit reinem Lithiumcarbonat versetzt, wobei die Verbindung von Lithiumlactat entstand. Weiter untersuchte ich die Konzentration der Milchsäure in der Lösung polarimetrisch nach der Yoshikawaschen Formel.

$$C = \frac{0,2864 - \sqrt{0,082025 - 0,0162}}{0,0081}$$

C.....Konzentration des Lithiumlactats.

$\alpha$ .....Drehungswinkel.

Die Lösung drehte die Polarisationssebene nach rechts.

$$\alpha = -0,27$$

$$\therefore C = 0,9629$$

Die Menge der Lösung war 25 cem.

$$\therefore \text{Lithiumlactat} \quad 0,9629 \times \frac{25}{100} = 0,2407 \text{ g}$$

$$\therefore \text{Milchsäure} \quad 0,2257 \text{ g}$$

Da zu dieser Untersuchung das Blut der 4maligen Experi-

mente benützt wurde, welches im ganzen 1000 ccm betrug, ist also die Konzentration der Milchsäure im Blut 22,5 mg/dl, was gerade mit dem Werte, welcher auf kolorimetrischem Wege gewonnen wurde, übereinstimmt.

#### *Mageninhalt.*

Der Mageninhalt, der während der Durchblutung sezernierte, wurde so wie das Blut behandelt. Die Lithiumlactatlösung dreht das polarisierte Licht nach rechts.

$$\alpha = -0,02$$

$$\therefore C = 0,0699$$

Die Menge der Lithiumlactatlösung in 20 ccm Rohr betrug 25 ccm.

$$\therefore \text{Lithiumlactat} = 0,0174$$

$$\therefore \text{Milchsäure} = 0,0162$$

Zu dieser Untersuchung wurde der Magensaft von den 4 Versuchen zusammengebracht. Also betrug die *d*-Milchsäure des Magensaftes im einzelnen Versuche durchschnittlich 4 mg.

#### *Versuch II.*

##### *Blut.*

Bei dieser Untersuchung wurde das durchgeblutete Blut von 6 Experimenten zusammen bearbeitet.

$$\alpha = -0,48$$

$$\therefore C = 1,283$$

Die Menge der Lösung betrug 25 ccm.

$$\therefore \text{Lithiumlactat} = 0,4320$$

$$\therefore \text{Milchsäure} = 0,4007$$

Das Ausgangsblut war zusammen 1500 ccm. Also war die Konzentration der Milchsäure im Blute 26,7 mg%.

##### *Magensaft.*

Unter den 6 Versuchen beobachtete ich in 3 Fällen eine mässige Blutung im Mageninhalt. Die Menge des Magensaftes, der während der Durchblutung sezernierte, war ganz gering.

Sie betrug im allgemeinen 20–30 ccm. Auch wenn die Blutung ganz geringgradig ist, sieht das Sekret wegen seiner kleinen Menge gewöhnlich sehr rot aus. Da aber dieses Sekret zu bearbeiten sehr unangenehm war, wurde der Mageninhalt von anderen tadellosen Versuchen zur Untersuchung genommen. Diesmal konnte ich aber keine Drehung der Polarisationssebene nachweisen, was wahrscheinlich auf der kleinen Menge des Lithiumsalzes beruht.

### III.

Die einzelnen Portionen der Lithiumlactatlösung, die polarimetrisch untersucht worden waren, wurden zusammengebracht, mit Wasser verdünnt, mit Phosphorsäure stark angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde mit Na-Sulfat versetzt, um das Wasser zu beseitigen. Dann wurde der Äther abgedampft, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen, mit Bleikarbonat behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit  $H_2S$  behandelt. Die bleifreie wässrige Lösung wurde mit Zinkoxyd versetzt, auf dem Wasserbade 30' lang erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingengt, mit einer kleinen Menge Alkohol versetzt und stehen gelassen. Das Milchsäurezink kristallisierte sich aus. Die Ausbeute betrug 0,2254 g.

Kristallwasserbestimmung; Substanz 0,1946 g wog nach Erhitzen (in  $115^\circ C$  2 St. lang) 0,1702 g.

$$H_2O = 0,0244$$

Berech. für  $C_6H_{10}O_6 Zn + 2HO$ ; 12,9%

Gef. 12,5%

Analyse: 0,1031 g Substanz gaben 0,1085 g  $CO_2$  und 0,0373 g  $H_2O$

Berech. für  $C_6H_{10}O_6 Zn$ ; C=29,5% H=4,10%

Gef. C=28,7% H=4,04%

### SCHLÜSSE.

1. 1.*dl*-Alanin und *d*-Alanin wurden in der Magenwand unter oxydativer Desaminierung abgebaut, um Milchsäure zu bilden.

2. Nach Durchblutung des Magens mit *d*-Alanin wurde *d*-Milchsäure rein isoliert.

3. Das Alanin und die gebildete Milchsäure wurden teilweise in dem Magensaft vorgefunden, der während der Durchblutung sezerniert wurde.

## LITERATUR.

- Cohnheim, O. (1909): Zeitschr. f. Physiol. Chemie, **59**, 239.  
Embden, Salomon u. Schmidt. (1906): Beiträge z. Chem. Physiol. u. Pathol., **8**, 129.  
Horodynski, Salaskin u. Zaleski (1902): Zeitschr. f. Physiol. Chemie, **35**, 246.  
Matsuoka, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 968.  
Noorden, V. u. Embden (1906): Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw., **2**.  
Salaskin (1898): Zeitschr. f. Physiol. Chemie, **25**, 449.  
Yoshida, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zassi, **8**, 477.

## DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji)

### III. Mitteilung.

#### Über den Acetonkörper im Magensaft, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der Magenwand.

VON

K. IKEBE.

(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 15. Dezember 1932)

Vor kurzem (1931) teilte ich mit, dass der Acetonkörper im menschlichen sowie im tierischen Magensekret sich als normaler Bestandteil vorfindet. Damals drückte ich die Meinung aus, dass das Vorkommen des Acetonkörpers im Magensaft nicht durch die Permeabilität der Blutgefäße zu erklären sei, der Acetonkörper also nicht aus dem Blutaceton herstamme, sondern dass er in der Magenwand gebildet und mit dem Magensekret in den Magensack mitsezerniert werde. Dies deshalb, weil es nicht nur kein konstantes Mengenverhältnis zwischen dem Acetonkörper einerseits im Blute und andererseits im Magensaft gab, sondern auch weil die  $\beta$ -Oxybuttersäure im Magensaft sich immer in höherem Grad als im Blute vertreten war. Der im Magensaft gefundene Acetonkörper schwankte in seiner Menge je nach den Bedingungen, unter welchen der Magensaft sezerniert wurde. Es wurde nämlich der Gehalt an  $\beta$ -Oxybuttersäure im reinen Magensaft, welcher nach Fleischfütterung vom Kleinmagenhunde gewonnen wurde, deutlich höher gefunden, als im Magensaft, welcher infolge von Histamininjektion sezerniert wurde. Früher hatte Matsuoka(1930) ein ähnliches Verhalten der Milchsäure im Magensaft beobachtet, indem der Gehalt an Milchsäure im infolge von Fleischfütterung sezernierten reinen Hundemagensaft immer höher gefunden wurde, als im Magensaft, welcher nach Histamininjektion ausfloss. Wenn man diese Tatsachen zusammenfasst, kann ohne Zwang angenommen

werden, dass der Grund der Differenz zwischen den beiden Fällen höchst wahrscheinlich darin liegt, dass die Muttersubstanzen des Acetonkörpers und der Milchsäure im Fleisch, welches an sich die Sekretion stark erregt, enthalten sind, und dass diese Substanzen im Momente ihrer Einwirkung chemisch gespalten werden, um den Acetonkörper und die Milchsäure zu bilden. Das Histamin ist wie bekannt ein starker Erreger der Magensaftsekretion, aber es ist konstitutionell kein Bildner des Acetonkörpers und der Milchsäure. Im allgemeinen ist das Schicksal der Erreger in der Magenschleimhaut uns sehr wenig bekannt. Neulich bestätigte Matsuo (1932) experimentell, dass das *D*-Alanin in der Magenwand zu *D*-Milchsäure abgebaut wurde, welche teilweise im Magensaft sich vorfand. Nach diesem Ergebnisse erscheint es plausibel, dass die Erreger teilweise in der Magenwand chemisch umgewandelt werden. Wenn man annimmt, dass der Acetonkörper, der sich im Magensaft befindet, in analoger Weise mit der Entstehung der Milchsäure aus Muttersubstanz in der Magenwand chemisch entstehen kann, so kommt als Muttersubstanz vor allem das Leucin in Frage, weil das Leucin einerseits ein starker Erreger der Magensaftsekretion ist und andererseits als Acetonbildner in der Leber schon bekannt ist. Ich injizierte also dem Kleinhirnhunde einmal *L*-Leucin intravenös und ein anderes Mal Histamin subcutan, wodurch reichlich genug Magensaft sezerniert wurde, um den Acetonkörper quantitativ zu bestimmen. Im ersteren Falle bekam ich durchschnittlich Aceton in 1.05 mg%, Acetessigsäure in 5.8 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure in 5 mg% und im letzteren im Durchschnitt Aceton in 0.42 mg%, Acetessigsäure in 2.3 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure in 3.9 mg%. Der Acetonkörper wurde also im Magensaft, welcher durch Leucin sezerniert wurde, viel höher gefunden, als im durch Histaminreiz gewonnenen Magensaft. Nach diesem Resultate erscheint es höchst wahrscheinlich, dass das injizierte Leucin im Momente der sekretorischen Einwirkung auf die Magenschleimhaut chemisch in den Acetonkörper umgewandelt wurde. Aber dies muss noch sicher bestätigt werden, weil es auch die Möglichkeit gibt, dass der Acetonkörper nicht direkt aus dem Leucin abgespalten wird, sondern aus durch den Leucinreiz

hervorgerufenen, uns unbekannten chemischen Prozessen im Organismus entstehen mag. In Wirklichkeit gibt es bisher in der Literatur keinen Beweis dafür, dass das Leucin in der Magenwand chemisch zersetzt wird. Auch sind Untersuchungen über die chemischen Vorgänge in der Magenschleimhaut nur wenig gemacht. Bei uns sind Durchblutungsversuche des Magens unternommen worden, um den Chemismus der Magenschleimhaut zu studieren. Yoshida u. Sumida (1932) beobachteten, dass der Harnstoff in der Magenwand Ammoniak abspaltete. Wie schon gezeigt wurde, lieferte das *d*-Alanin dort unter Desaminierungsprocess *d*-Milchsäure. Die Erreger und Abbauprodukte fanden sich immer teilweise im Magensaft. Ich durchblutete auch mit *l*-Leucin den Hundemagen, um zu erfahren, ob das Leucin tatsächlich in der Magenwand in den Acetonkörper umgewandelt wird, und in welcher Weise das Leucin und seine Abbauprodukte im Blute, in der Schleimhaut und im Magensaft sich verteilt befinden. Die Durchblutung dauerte stets über 3 Stunden. In den Kontrollversuchen ohne Leucin zeigte die Menge der einzelnen Acetonkörper im durchgeströmten Blut immer fast den gleichen Wert wie den des Acetonkörpers im Blute vorher. Immer wurde Ammoniak sehr viel mehr im nachherigen Blute als im Blute vor der Durchströmung gefunden. Im Magensaft, welcher infolge blosser Durchblutung ohne Leucin sezerniert wurde, fanden sich Aceton in 0.28 mg%, Acetessigsäure in 0.73 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure in 5.99 mg%. In den Hauptversuchen wurde der Acetonkörper ohne Ausnahme im Nachblut in bedeutend höherer Menge als im Vorblute gefunden. Es wurden nämlich im Vorblute durchschnittlich Aceton in 1.96 mg%, Acetessigsäure in 5.32 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure in 7.16 mg% gefunden, im Nachblute dagegen Aceton in 4.91 mg%, Acetessigsäure in 9.23 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure in 8.68 mg%. Da die Bestimmung des Acetonkörpers nach der Mikromethode ausgeführt wurde, sicherte ich den Befund weiter durch die Bestimmung nach der Messinger-Huppert'schen Methode, wo in den Kontrollversuchen der Acetonkörper nach blosser Durchblutung keine Vermehrung zeigte, während in den Hauptversuchen der Acetonkörper im Nachblut sich immer in

4fach grösser Menge als im Vorblute vorfand. Der Aminostickstoff, der im Vorblut sich in 45.63 mg% fand, verminderte sich im Nachblute bis auf 29.26 mg%, indem das Ammoniak sich fast bis zum 3fachen gegenüber den Kontrollversuchen vermehrte. Im Mangensaft fand sich der Acetonkörper gegen die Kontrollversuche stark vermehrt, wie die Tabelle zeigt. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass der Acetonkörper unter Verbrauch von *l*-Leucin während der Durchblutung des Magens entstand, und dass der gebildete Acetonkörper in den Magensaft austrat. Aus dem im Blut zurückgebliebenen Aminostickstoff umgerechnet war das Leucin in einer Menge von 0.43–0.55 g verloren gegangen. Aber höchst wahrscheinlich dürfte das Leucin nicht nur im Blute zurückbleiben, sondern wird sich teilweise in der Magenschleimhaut ablagern und teilweise sich im Magensaft vorfinden. In zwei Versuchen untersuchte ich also die Verteilung des Leucins in den oben genannten Stellen. In einem Versuche bekam ich das Leucin als Kupfersalz mit 0.2418 g im Blute, 0.0434 g im Mangensaft und ganz spurweise in der Magenschleimhaut. Als Kupfersalz wurden also zusammen 0.2852 g zurückgewonnen. Im anderen Versuche bekam ich Leucinkupfer 0.2721 g im Blute, 0.0421 g im Mangensaft und nur spurweise in der Magenschleimhaut. Es betrug zusammen 0.3142 g. Im Leucinkupfersalz ist Leucin im ersteren Falle mit 0.2292 g und im letzteren mit 0.2526 g enthalten. Also betrug das verloren gegangene Leucin 0.24 g im ersteren und 0.27 g im anderen Falle. Wenn das gesamte verlorene Leucin in Acetonkörper umgewandelt würde, müsste seine Menge beträchtlich grösser sein, wogegen der gefundene Acetonkörper im Blute und im Mangensaft als Aceton umgerechnet nur 6.14–26.42 mg betrug. Das Leucin wird tatsächlich in der Magenwand zum Acetonkörper umgewandelt, aber man muss annehmen, dass es auch in andersartiger Weise chemisch zersetzt wird, weil der nachweisbare Acetonkörper nur in geringer Menge vorkommt.

Ich möchte hier mit besonderer Betonung darauf hinweisen, dass Yoshida bei der Durchblutung mit Histamin immer in der Schleimhaut eine gewisse Menge von Histamin zurückgewinnen konnte, wogegen das Leucin in meinen Versuchen nur spurweise in

der Schleimhaut vorgefunden wurde.

Wie ich oben schrieb, wurden Histamin u. Alanin nach Durchblutung des Magens in sämtlichen Versuchen im Mageninhalt gefunden. Ich fand auch bei meinen Versuchen Leucin im Mageninhalt. Diese Befunde werden in Bezug auf das Castrinproblem nicht ausser Acht gelassen werden können, weil die obigen Substanzen alle starke Erreger der Magensaftsekretion sind.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

##### I. Versuche mit dem Kleinmagenhund.

Am Hunde wurde eine Kleinmagenfistel nach Pawlow angelegt. Wenn der Hund sich wieder in voller Gesundheit befand, wurde bald Histaminchlorhydrat 1–2 mg subcutan injiziert, bald l-Leucin 0.5 g intravenös dargereicht. Der dadurch sezernierte Magensaft wurde auf Aceton, Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure quantitativ nach Takahata u. Kume (Mikrobestimmung) untersucht.

TABELLE I.

Klein-Magenhund Nr.	Injizierte Mittel	Aceton (mg %)	Acetessig- säure (mg %)	$\beta$ -Oxybutter- säure (mg %)	Gesamt- acidität	Freie Salz- säure	Menge ccm	Schleim
II	Histamin 2 mg	0.51	2.83	4.16	140	130	40	—
III	„	0.34	1.83	3.75	160	155	40	—
Durch- schnittl.		0.43	2.33	3.96				
III	Leucin 0.5 gr.	1.19	6.23	6.25	92.5	82.5	20	±
I	„	1.02	5.50	3.75	130	115	28	±
Durch- schnittl.		1.11	5.87	5.00				

Im Durchschnitt fand ich im Magensaft, der durch Histamininjektion gewonnen wurde, Aceton 0.42 mg%, Acetessigsäure 2.33 mg% und  $\beta$ -Oxybuttersäure 3.9 mg%, aber im Magensaft, der durch Leucindarreichung sezerniert wurde, Acetonkörper gegen-

über dem ersteren Fall in einer 2–3fach grösseren Menge.

## II. Durchblutungsversuche des Magens mit *l*-Leucin.

Hundemagen wurden gebraucht. Die Methode der Durchblutung des Magens war genau dieselbe wie bei Yoshida und Matsuoka. Die Durchblutungen dauerten immer über 3 Stunden. Nach der Durchblutung wurden Blut und Mageninhalt auf Acetonkörper und auf zurückgebliebenes Leucin untersucht. Der Acetonkörper wurde nach Takahata-Kume'scher Methode bestimmt. Das Leucin wurde aus dem Aminostickstoffwert umgerechnet.

Der Acetonkörper wurde weiter auch nach der Messinger-Huppert'schen Methode bestimmt.

Im IV. und V. Versuche wurde das Leucin, welches im Blute und im Magensaft sowie in der Schleimhaut unzersetzt zurückgeblieben war, mittels Estermethode rein herausgenommen, in Kupfersalz umgewandelt und durch Kupferbestimmung identifiziert.

Versuch IV. Aus dem durchgeströmten Blute wurden 0.2418 g Leucinkupfer gewonnen.

Die Substanz 0.1012 lieferte Kupferoxyd 0.0248.

$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ :	Ber.	Gef.
Cu	19.6%	19.3%

Aus dem Magensaft, welcher während der Durchblutung sezerniert wurde, bekam ich 0.0434 g Leucinkupfer.

Substanz 0.0434 g ergab Kupferoxyd 0.0110 g.

Gefunden: 20.0% Cu.

Aus der Magenschleimhaut bekam ich 0.0079 g Leucinkupfer.

Kupferbestimmung wurde nicht gemacht.

Versuch V. Aus dem durchgeströmten Blute bekam ich 0.2721 g Leucinkupfer.

0.0934 Substanz ergaben 0.0236 g Kupferoxyd.

Gefunden: 19.9% Cu.

Aus dem Magensaft bekam ich Kupferoxyd 0.0421 g.

Die Substanz 0.0356 ergab 0.0086 g Kupferoxyd.

Gefunden: 19.0% Cu.

TABELLE II.  
Kontrollversuche.  
(Acetonkörper wurde nach Takabata und Kume'scher Methode bestimmt).

Nr.	Durchbl. dauer St.	Menge cem		Aceton (mg %)	Acetessig- säure (mg %)	β-Oxybutter säure (mg %)	Ammoniak- stickstoff (mg %)	Harnstoff- stickstoff	Amino- stickstoff	
I	3	250	Blut	Vor	0.51	1.83	4.16			
				Nach	0.68	1.83	3.80			
		15	Magensaft	0.34	0.73	6.25				
II	3	200	Blut	Vor	0.85	1.83	4.16	2.80		
				Nach	0.68	1.10	4.58	3.36	5.60	
		13	Magensaft	0.17	0.73	7.91				
III	3	250	Blut	Vor	0.34	1.83	4.16	0.81	9.87	
				Nach	0.68	1.83	5.00	1.12	2.28	
		30	Magensaft	0.17	0.73	3.80				
Durchschnittl.			Blut	Vor	0.57	1.83	4.16	0.24	2.52	9.87
				Nach	0.68	1.59	4.46	2.24	3.91	9.87
Durchschnittl.			Magensaft		0.23	0.73	5.99			

## Hauptversuche.

Nr.	Durchbl. dauer	Menge		Aceton (mg %)	Acetessigsäure (mg %)	$\beta$ -Oxybutter- säure (mg %)	Ammoniak- stickstoff (mg %)	Harnstoff- stickstoff (mg %)	Amino- stickstoff (mg %)	Alles zusammen in Aceton um- gerech. (mg %)	Neug ebildete Aceton in total mg.	Verlorenes Leucin g
I	3	300	Blut	2.04	6.60	6.25						
			Vor Nach Magensaft	6.82 0.85	8.06 4.76	6.25 8.33						
II	3.1	300	Blut	0.68	3.30	7.50			49.25	6.74	17.23	0.3943
			Vor Nach Magensaft	1.70 0.17	9.16 4.40	10.00 10.41			35.20	12.49	0.57	
III	3	260	Blut	0.68	3.66	8.33	0	11.20	47.29	7.41	5.98	0.5204
			Vor Nach Magensaft	1.70 1.34	5.50 1.83	8.75 8.33	5.66	8.85	25.89	9.71	0.16	
IV	3	300	Blut	5.80	5.50	6.25	1.68	2.60	43.57	12.41	21.50	0.4913
			Vor Nach Magensaft	11.09 0.17	8.80 4.40	6.25 5.50	2.80	5.60	29.43	19.58	5.73	0.19
V	3	300	Blut	1.70	5.50	8.33	1.68	3.36	44.25	9.48	25.74	0.4306
			Vor Nach Magensaft	3.91 0.85	14.66 4.40	10.41 6.25	4.20	1.68	28.91	18.06	6.89	0.68
VI	3.1	300	Blut	0.85	7.33	6.25	1.40	2.80	43.80	8.51	20.31	0.4811
			Vor Nach Magensaft	4.26 0.85	9.16 3.66	10.41 10.41	5.90	1.68	25.86	15.28	8.74	1.44
Durchschnittl.			Blut	1.93	5.32	7.16	1.19	4.99	45.63			
Durchschnittl.			Magensaft	4.91	9.23	8.68	4.50	4.70	29.26			
Durchschnittl.			Magensaft	0.54	3.91	8.21						

TABELLE III.  
(nach Messigner-Huppertscher Methode).  
Kontrollversuche.

Nr.			Durchbl. dauer	Aceton + Acetessigsäure (mg %)
I	Blut	Vor	3	1.62
		Nach		1.80
II	Blut	Vor	3	1.45
		Nach		1.36
Durchschnittl.		Blut	Vor	1.53
			Nach	1.58

## Hauptversuche.

Nr.			Durchbl. dauer	Aceton + Acetessigsäure (mg %)
I	Blut	Vor	3	1.80
		Nach		6.22
II	Blut	Vor	3	2.00
		Nach		11.60
III	Blut	Vor	3	2.36
		Nach		8.46
Durchschnittl.		Blut	Vor	2.05
			Nach	8.74

In der Magenschleimhaut wurde nur wenig Leucinkupfer gefunden.

## LITERATUR.

- Ikebe, K.: Nagasaki Igakkai Zassi, 8.  
 Matsuoka, Y.: Nagasaki Igakkai Zassi, 8.  
 Matsuoka, Y.: This Journ.,  
 Yoshida, Y.: This Journ.,  
 Yoshida u. Sumida: Nagasaki Igakkai Zassi, 10.



## ÜBER FERMENTATIVE AUFSCHLIESSUNG DES DIKETOPIPERAZINRINGS.

VON

TAKASHI ISHIYAMA.

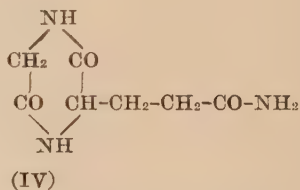
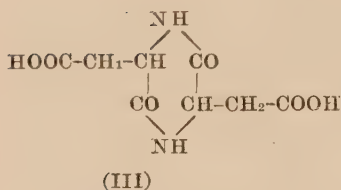
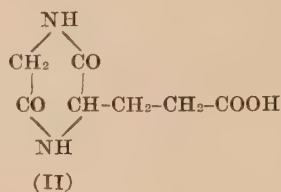
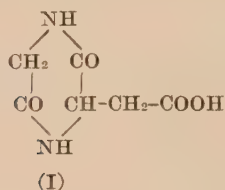
(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba.  
Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1932)

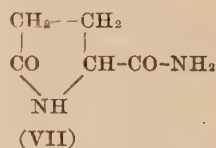
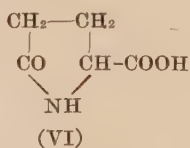
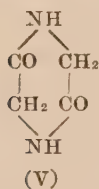
Über die proteolytischen Fermente sind jetzt Studien im hiesigen Institut auf zwei Leitlinien im Gange. Erstens die Synthese der für die Proteinase spezifisch eingestellten Polypeptide und zweitens die Frage über die enzymatische Aufschliessung des Diketopiperazinrings. So haben Suzuki (1931) und Matsui (1933) das Asparagyldityrosin und das Asparagyldiglycyltyrosin dargestellt, die zwar durch das aktivierte Trypsin, aber weder durch das nicht-aktivierte Trypsin noch durch Erepsin hydrolysiert werden konnten. Die lange erwünschte Synthese des spezifischen Substrats für die Trypsin-Kinase war somit gelungen. Hinsichtlich der Diketopiperazinfrage ist eine Angabe von Matsui (1933) sehr bemerkenswert. Er hat das Glycylaminomalonsäureanhydrid dargestellt und dessen tryptische Spaltbarkeit gefunden. Die Aminosäure kommt, soweit man weiss, nicht als natürlicher Baustein des Eiweisses vor. Es war also weiter zu forschen, ob die Diketopiperazine, die ausschliesslich aus den natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind, überhaupt fermentativ aufgespalten werden können. Der Verfasser hat daher unter Leitung von Prof. Akamatsu die Diketopiperazinderivate synthetisiert und ihr Verhalten gegen die Proteasen untersucht. Wie man aus den Arbeiten des hiesigen Instituts über Proteasenforschung ersieht, interessieren wir uns für die Monoaminodicarbonsäure als Polypeptidbestandteil. Die hier mitzuteilenden Diketopiperazine enthalten daher auch die Dicarbonsäure.

Die dargestellten Verbindungen waren I) das Glycylasparaginsäureanhydrid (Diketopiperazin-mono-essigsäure), II) das Glycyl-

glutaminsäureanhydrid (Diketopiperazin-mono-propionsäure), III) das Asparagylasparaginsäureanhydrid (Diketopiperazin-di-essigsäure) und IV) das Glycylglutaminanhydrid (Diketopiperazin-mono-propionsäureamid).



Ausserdem wurden V) das Glycinanhydrid (Diketopiperazin), VI) die Pyrrolidoncarbonsäure und VII) das Pyrrolidoncarbonsäureamid aufgebaut und fermentativ geprüft.



Die Experimente ergaben, dass das Glycylasparaginsäureanhydrid, das Glycylglutaminsäureanhydrid und das Asparagylasparaginsäureanhydrid, genau so wie das Glycylaminomalonsäureanhydrid von Matsui (1933) durch das Trypsin und noch energischer durch das aktivierte Trypsin hydrolysierbar sind. Die anderen Arten von Proteasen vermochten sie aber nicht anzugreifen. Jene 3 Diketopiperazine haben eine oder zwei Carboxylgruppen an der Seitenkette. Das Vorhandensein dieser chemischen Gruppierung sprechen wir als eine Grundbedingung für die fermentative Aufschliessbarkeit des Diketopiperazinrings an, weil wir

andererseits beweisen konnten, dass das Glycylglutaminanhydrid wegen seiner bedeckten Carboxylgruppe gegen proteolytische Fermente ganz resistent war. Man kennt ja schon lange die fermentative Nichtspaltbarkeit des Glycinanhydrids, des Diketopiperazins selbst. Dem Diketopiperazinring gegenüber war der Pyrrolidonring so fest, dass er durch die Proteasen nicht aufgeschlossen werden konnte.

Durch die vorliegenden Experimente kennen wir nun eine Grundbedingung für den Diketopiperazinabbau. Die fermentative Aufspaltbarkeit des Diketopiperazinrings konnte durch sie eindeutig festgestellt werden.

Hinsichtlich der Eiweisstruktur wird heute im allgemeinen der Aufbau aus langen Polypeptidketten nach der ursprünglichen Vorstellung von Fischer angenommen. Früher herrschte in der Chemie zur Aufklärung des Aufbaus der hochmolekularen Naturstoffe die Grundkörpertheorie. Im Eiweisskörper betrachtete man als Grundkörper z.B. Diketopiperazin. Diese Theorie ist aber inzwischen, vom chemischen wie enzymologischen Standpunkt aus betrachtet, hinfällig geworden. Bei der fermentativen Eiweisspaltung beobachtet man keine reine Desaggregation, aber den Zuwachs der Amino- und Carboxylgruppe in äquivalenter Menge. Obwohl gegen die Assoziationstheorie der Eiweisstruktur von vielen Seiten starke Einwendungen gemacht worden sind, müsste doch das Vorkommen von Polypeptidanhydrid im Eiweissmolekül wenn auch nur als eine Arbeitshypothese gesondert untersucht werden. Das Teilnehmen von Dicarbonsäuren oder Diaminosäuren an dem Diketopiperazin lässt noch die Carboxyl- resp. Amino- gruppe übrig, die weiter mit anderen Aminosäuren peptidartig bindungsfähig ist. Bei der Aufschliessung des Diketopiperazinrings werden Amino- und Carboxylgruppe in äquivalenter Menge 1:1 frei gemacht. Man kennt nun entgegen der früheren Annahme die enzymatische Spaltbarkeit des Diketopiperazinrings.

Kürzlich haben Abderhalden und Schwab (1932) eine interessante Mitteilung gemacht. Diese Autoren haben Leucyl-[glycyl-tyrosin-anhydrid], Leucyl-[glycyl-leucinanhydrid] und Leucyl-[glycyl-serinanhydrid] dargestellt. Diese Aminosäure-[Di-

ketopiperazin]-Verbindungen waren entgegen der Annahme von Bergmann und Mitarbeitern im freien Zustand beständig. Sie wurden durch das Erepsin oder das aktivierte Trypsin je nach den Arten der an den Diketopiperazinen teilnehmenden Aminosäuren aufgespalten, und zwar bemerkenswerter Weise zuerst an dem Diketopiperazinring. Wir erwarten, dass die Angabe von Abderhalden und Mitarbeitern allgemein anerkannt werde. Man kann ihrem Ergebnis, unsere vorliegenden Experimente in Erwägung ziehend, dahin Ausdruck geben, dass das Binden der Iminogruppe des Diketopiperazins mit der Carboxylgruppe einer Aminosäure eine andere Grundbedingung für die fermentative Aufschliessung des betreffenden Peptidanhidrids liefert. Wenn jedoch eine solche Bindungsweise der Aminosäuren überhaupt im Eiweissmolekül vorkommen sollte, sollte die Zunahme der Amino- und Carboxylgruppen bei dem fermentativen Abbau des Eiweisses nicht immer in äquivalenter Menge fortschreiten, was selbstverständlich von den Proteaseforschern nicht übersehen werden darf.

## Experimenteller Teil.

### I. DARSTELLUNG DER SUBSTRATE.

#### A. *Glycylasparaginsäureanhydrid.*

Wir haben zuerst Asparaginsäureäthylesterchlorhydrat bereitet. Ausbeute: 34.5 g aus 25 g Asparaginsäure. Das Esterchlorhydrat wurde nach Fischer und Königs (1904) chloracetyliert. Ausbeute: 12 g Chloracetylasparaginsäureäthylester aus 34 g Asparaginsäureesterchlorhydrat. 11 g dieses Esters wurden 2 Stunden mit 90 ccm 2.3*N*-alkoholischem Ammoniak auf 100° in Druckflasche erhitzt. Beim Stehenlassen bei Zimmertemperatur schied sich in 2 Tagen das Glycylasparaginsäureesteranhydrid aus. Es wurde aus heissem Wasser umkristallisiert. Das Esteranhydrid kristallisierte in Blättchen und schmolz bei 211°. Ausbeute 3.5 g

Analyse:

0.1966 g Substanz lieferte 0.0274 g Kjeldahl-N.

Für  $C_8H_{12}N_2O_4$  (200.1)      berechnet 14.03% N,  
 gefunden 13.95% N.

Um den Ester zu verseifen, wurden 3 g Anhydridester mit 45 ccm 4N-Ba(OH)<sub>2</sub> versetzt. Die Substanz ging bald in Lösung. Nach Zusatz von 180 ccm N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Lösung filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft; dabei schied sich das Glycylasparaginsäureanhydrid als Kristalle ab. Die Butterlauge lieferte bei Alkoholzusatz eine zweite Kristallisation. Schmelzpunkt 270°. Ausbeute 2 g.

Analyse:

0.1720 g lieferte 0.0276 g Kjeldahl N.

Für  $C_6H_8N_2O_4$  (172.1)      berechnet 16.28% N,  
 gefunden 16.05% N.

#### B. *Asparagylasparaginsäureanhydrid.*

Dieses Anhydrid, Diketopiperazin-di-essigsäure, wurde schon von Fischer und Königs (1907) angegeben. Wir haben den Asparaginsäuremethylester statt des Erhitzens auf 100° bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure aufbewahrt. In einigen Tagen verwandelte sich die Flüssigkeit in einen kristallinen Brei. Er wurde auf Nutsche stark gepresst und zuerst mit Alkohol, dann mit verdünnter Salzsäure gewaschen. Wir haben auf diese Weise aus 45 g Asparaginsäuremethylesterchlorhydrat 3.5 g Diketopiperazin-di-essigsäuremethylester erhalten. Schmelzpunkt 132°.

Analyse:

0.1152 g lieferte 0.0123 g Kjeldahl-N.

Für  $C_{10}H_{14}N_2O_6$  (258.1)      berechnet 10.85% N,  
 gefunden 10.69% N.

Der erhaltene Diketopiperazin-di-essigsäuremethylester wurde weiter genau nach der Vorschrift von Fischer und Königs verarbeitet, und endlich das gesuchte Anhydrid als prismatische Kristalle erhalten. Ausbeute: 2.5 g aus 3.2 g Ester.

Analyse:

0.170 g lieferte 0.02052 g Kjeldahl-N.

Für  $C_8H_{16}N_2O_6$  (230.1)      berechnet 12.17% N,  
    gefunden 12.07% N.

*C. Glycylglutaminanhydrid.*

Dieses Anhydrid wurde vor 4 Jahren von T. Oda im hiesigen Institut dargestellt. Da es bisher keine Gelegenheit zur Veröffentlichung gab, soll jetzt das Verfahren mitgeteilt werden:

*1. Glutaminsäureäthylesterchlorhydrat.*

30 g Glutaminsäure wurden in 300 ccm absoluten Alkohol suspendiert und mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Die Glutaminsäure ging inzwischen in Lösung. Die Lösung wurde mit 600 ccm Alkohol versetzt, unter Rückflusskühler 4 Stunden gekocht und unter vermindertem Druck eingedampft. Der syrupöse Rückstand wurde in Alkohol gelöst und wieder eingedampft. Man wiederholte das Lösen und Eindampfen noch 2 Mal. Der endliche syrupöse Rückstand wurde im Exsikkator auf Schwefelsäure und Natron aufbewahrt. Das Chlorhydrat kristallisierte dabei in Nadeln. Schmelzpunkt 93–95°. Ausbeute 41 g.

Analyse:

0.1029 g Substanz lieferte 0.00595 g Kjeldahl-N.

0.1491 g Substanz enthielt nach Volhard 0.0221 g Cl.

Für  $C_9H_{18}NO_4Cl$  (239.62)      berechnet 5.85% N, 14.80% Cl,  
    gefunden 5.79% N, 14.82% Cl.

*2. Chloracetylglutaminsäureäthylester.*

24 g Glutaminsäureesterchlorhydrat wurden in 200 ccm Äther suspendiert und unter starkem Kühlen mit 50 ccm 2N-NaOH versetzt. Um den Übergang des freien Esters in Äther zu erleichtern, wurde die wässrige Schicht weiter mit Kochsalz gesättigt. Die Chloracetylierung geschah durch Zusatz von 6.2 g Chloracetylchlorid in 25 ccm Äther, und dann von abwechselnd 12 g wasserfreiem Natriumcarbonat in 150 ccm Wasser und 6.2 g Chloracetylchlorid in Portionen. Das Verfahren dauerte eine Stunde. Die ätherische Schicht trocknete man mit Natriumsulfat. Beim Verdampfen des Äthers kristallisierte der Chloracetylglutaminsäure-

äthylester in Nadeln. Schmelzpunkt 55°. Ausbeute 20 g.

Analyse:

0.1137 g lieferte 0.005628 g Kjeldahl-N.

0.1258 g lieferte nach Veraschung 0.01597 g Cl.

Für  $C_{11}H_{18}O_5N$  Cl (279.7) berechnet 5.01%N, 12.68%Cl,  
gefunden 4.95%N, 12.70%Cl.

### 3. Glycylglutaminanhydrid.

10 g Chloracetylglutaminsäureäthylester wurden in 100 ccm von bei 0° gesättigtem alkoholischen Ammoniak gelöst und bei 37° stehen gelassen. In 4 Tagen schieden sich 4 g Anhydrid kristallinisch ab. Es wurde aus heissem Wasser umkristallisiert. Sechseckige Blättchen. Aus 90%igem Alkohol umkristallisiert, bildete die Substanz Nadeln. Schmelzpunkt 248°–250° unter Zersetzung.

Analyse:

0.1044 g Substanz lieferte 0.0566 g  $H_2O$ , 0.1796 g  $CO_2$ .

0.1032 g Substanz lieferte 0.0545 g  $H_2O$ , 0.1675 g  $CO_2$ .

0.0623 g Substanz lieferte 0.01435 g Kjeldahl-N.

0.0451 g Substanz lieferte 0.01078 g „

Für  $C_7H_{11}N_3O_3$  (185) berechnet 45.5%C, 5.95%H, 22.7%N,  
gefunden 45.5%C, 5.96%H, 22.8%N.

### D. Glycylglutaminsäureanhydrid.

Zuerst wurde wie bei dem vorigen Anhydrid Chloracetylglutaminsäureäthylester dargestellt. Die konzentrierte ätherische Lösung des Esters wurde mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Beim Impfen mit Kristallkörnchen schied sich der Ester bald als schön ausgebildete Kristalle ab. 8 g Ester wurden in 92 ccm 0.93-N ammoniakalischem Alkohol gelöst und in Druckflasche zwei Stunden auf 100° erhitzt. Beim Stehenlassen bei Zimmertemperatur schied sich in 2 Tagen eine kristallische Masse aus. Sie wurde auf Nutsche gesammelt, zuerst mit Alkohol und dann mit verdünnter Salzsäure gewaschen und aus heissem Wasser umkristallisiert. Das Glycylglutaminsäureäthylesteranhydrid bildete tafelförmige Kristalle. Schmelzpunkt 140°. Ausbeute 2 g.

## Analyse:

0.2711 g Substanz lieferten 0.0354 g Kjeldahl-N.

Für  $C_9H_{14}N_2O_4$  (214.16)      berechnet 13.08%N,  
    gefunden 13.05%N.

1.5 g Esteranhydrid wurden mit 26.8 ccm 3.15 N-Barytlösung versetzt. Die Substanz löste sich bald. Nach Zusatz von 82.3 ccm N/10  $H_2SO_4$  und Abfiltration von Bariumsulfat wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft. Das Glycylglutaminsäureanhydrid kam dabei als tafelförmige Kristalle zur Abscheidung. Alkoholzusatz an die Mutterlauge brachte eine zweite Kristallisation. Schmelzpunkt  $225^\circ$ . Ausbeute 1 g.

## Analyse:

0.1533 g Substanz lieferte 0.0229 g Kjeldahl-N.

Für  $C_7H_{10}N_2O_4$  (186.12)      berechnet 15.05%  
    gefunden 14.94%

*E. Glycylglycinanhydrid.*

Dieses Anhydrid wurde nach Fischer (1906) aus dem Glycin-äthylesterchlorhydrat hergestellt.

*F. Pyrrolidoncarbonsäure.*

Dies wurde prinzipiell nach Dolinek (1927) von Kurata im hiesigen Institut durch Erhitzen der Glutaminsäure mit Wasser im Autoklaven, Eintrocknen im Vakuum und nachherige Fällung des alkoholischen Extrakts mit Äther hergestellt. Es war aber nicht ganz rein, und analytisch und kryoskopisch wurde bewiesen, dass es, wenn auch wenig, so doch von Glutaminsäure verunreinigt war. Dieses Präparat wurde im Experiment gebraucht. Der Verfasser selbst wollte Glutamylglutaminsäureanhydrid nach Vorschrift von Blanchetière (1922) durch Erhitzen der Glutaminsäure mit Glyzerin herstellen und hat wie dieser französische Forscher ein Bariumsalz erhalten. Aber die von Barium quantitativ befreite Säure möchte ich nach der kryoskopischen Untersuchung als Pyrrolidoncarbonsäure betrachten. Fermentativ war die Substanz wie die Pyrrolidoncarbonsäure ganz unangreifbar.

*G. Pyrrolidonecarbonsäureamid.*

Zuerst wurde Pyrrolidonecarbonsäureäthylester nach Fischer und Böhner (1911) hergestellt. Schmelzpunkt 125°.

32 g Äthylester wurden mit 320 ccm gesättigtem alkoholischen Ammoniak in geschlossener Flasche bei Zimmertemperatur 24 Stunden aufbewahrt. Bei Kühlen und Reiben an der Flaschenwand schied sich das Pyrrolidonecarbonsäureamid kristallinisch ab. Es konnte aus wenigem Wasser umkristallisiert werden. Ausbeute 11 g. Schmelzpunkt 165°.

*H. Glycylasparagin.*

Dargestellt nach Fischer und Königs (1904).

*I. Glycylglutaminsäure.*

Dargestellt nach Fischer, Kropp und Stahl Schmidt (1909).

II. FERMENTLÖSUNGEN.

Die Trypsinlösung wurde nach Waldschmidt-Leitz (1927) dargestellt. Sie war in nichtaktivierter Form. Die Enterokinase wurde nach der Vorschrift von Waldschmidt-Leitz (1927) bereitet. Die Aktivierung des Trypsins wurde in üblicher Weise ausgeführt. Die Erepsinlösung nach Rice (1915). Durch Prüfung auf Carminfibrin und Glycylasparagin wurde die Einheitlichkeit jeder Fermentlösung festgestellt. Pepsin von Kahlbaum.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen wird in jedem nachfolgenden Protokolle angegeben. PH-Bestimmung elektrometrisch nach Anstellung der Versuche. Versuchstemperatur 37°. Der Zuwachs der Carboxylgruppe wurde an in bestimmtem Zeitabstand auspipettierten 5 ccm Versuchslösung durch alkoholische Titration nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz ermittelt. Die totale Spaltung einer CO-NH-Bindung wurde als 100%ige Hydrolyse vorausgesetzt und das hydrolytische Prozent damit aus der gebrauchten Menge von  $N/5$  alkoholischer Kalilauge berechnet.

Ein Kontrollversuch ohne Substrat wurde jedesmal parallel ausgeführt und der Hauptversuch damit korrigiert. Die Beständigkeit der Substrate sowohl bei  $P_H$  2 als  $P_H$  8 wurde vorher festgestellt.

#### IV. ERGEBNISSE.

##### A. *Glycylasparaginsäureanhydrid*.

Das Anhydrid war resistent gegen Pepsin oder Erepsin, wurde aber durch Trypsin und noch energischer durch Trypsin-Kinase angegriffen.

###### a. Trypsin.

Substrat	0.1074 g	} $P_H$ 8.03
Wasser	10 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 ccm	
Trypsin	6 ccm	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
COOH-Zuwachs in ccm <i>N</i> /5 KOH	0.09	0.12	0.13
Hydrolisengrad	11.5%	15.3%	16.6%

###### b. Trypsin-Kinase.

Substrat	0.1124 g	} $P_H$ 8.05
Wasser	10 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 ccm	
Trypsin-Kinase	6 ccm	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
COOH-Zuwachs in ccm <i>N</i> /5 KOH	0.19	0.25	0.30
Hydrolisengrad	23.4%	30.8%	37.0%

##### B. *Asparagylasparaginsäureanhydrid*.

Das Verhalten gegen Protease war dasselbe wie beim vorigen Anhydrid.

## a. Trypsin.

Substrat	0.1088 g	} $P_H$ 8.02
Wasser	10 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5 : 9.5)	4 ccm	
Trypsin	6 ccm	

Zeit in Std.	4 Std.	24 Std.	48 Std.
COOH-Zuwachs in ccm <i>N</i> /5 KOH	0.07	0.08	0.1
Hydrolisengrad	12.5%	14.2%	17.8%

## b. Trypsin-Kinase.

Substrat	0.1114 g	} $P_H$ 8.02
Wasser	10 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5 : 9.5)	4.5 ccm	
Trypsin-Kinase	6 ccm	

Zeit in Std.	4 Std.	24 Std.	48 Std.
COOH-Zuwachs in ccm <i>N</i> /5 KOH	0.15	0.21	0.26
Hydrolisengrad	25.8%	36.2%	44.8%

## C. Glycylglutaminanhydrid.

Dieses Anhydrid ist an seiner Seitenketten-Carboxylgruppe amidiert. Pepsin, Erepsin, Trypsin und Trypsin-Kinase konnten das Anhydrid nicht spalten.

## D. Glycylglutaminsäureanhydrid.

Diese Substanz verhielt sich wie das Glycylasparaginsäureanhydrid und wurde durch Pepsin oder Erepsin nicht gespalten, wohl aber durch Trypsin und Trypsin-Kinase.

## a. Trypsin.

Substrat	0.1 g	} $P_H$ 8.05
Wasser	10 ccm	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5 : 9.5)	4 ccm	
Trypsin-Kinase	6 ccm	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.
COOH-Zuwachs in cem <i>N</i> /5 KOH	0.06	0.17
Hydrolysengrad	8.9%	25.4%

## b. Trypsin-Kinase.

Substrat	0.1 g	} $P_H$ 7.9
Wasser	10 cem	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 cem	
Trypsin-Kinase	6 cem	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
COOH-Zuwachs in cem <i>N</i> /5 KOH	0.08	0.19	0.32
Hydrolysengrad	11.1%	26.3%	44.4%

## E. Glycylglycinanhydrid.

Wir konnten feststellen, dass dieses Anhydrid, Diketopiperazin, wie in der Literatur angegeben, gegen Protease ganz stabil ist.

## F. Pyrrolidoncarbonsäure und ihr Amid.

Sie wurden in keiner Weise fermentativ angegriffen.

## G. Glycylasparagin und Glycylglutaminsäure.

Beide Dipeptide sind bekanntlich nur durch Erepsin spaltbar.

Glycylasparagin	0.2294 g	} $P_H$ 7.76
Wasser	10 cem	
<i>M</i> /10 Phosphatpuffer (0.7:9.3)	5 cem	
Erepsin	5 cem	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.
COOH-Zuwachs in cem <i>N</i> /5 KOH	0.19	0.43
Hydrolysengrad	12.6%	28.6%

## H. Glycylglutaminsäure.

Substrat	0.211 g	} P <sub>H</sub> 7.75
Wasser	10 ccm	
M/10 Phosphatpuffer (0.7:9.3)	5 ccm	
Erepsin	5 ccm	

Zeit in Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
COOH-Zuwachs in ccm N/5 KOH	0.13	0.23	0.35
Hydrolysegrad	10.0%	17.8%	27.1%

Man sieht, dass die Glycylglutaminsäure bei der Anhydridbildung ihre ereptische Spaltbarkeit verliert und ein spezifisches Substrat für das Trypsinenzym wird.

## LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1932): Zs. f. physiol. Chem., **61**, 212.  
 Blanchetière, A. (1922): Bull. Soc. chim. France (4) **31**, 1045.  
 Dolinek, A. (1927): Z. Zuckerind. tschechoslowak. Rep., **52**, 35-43;  
 Chem. Zbl. 1928, **1**, 424.  
 Fischer, E. (1906): Ber. d. deut. chem. Ges., **39**, 2893  
 Fischer, E. u. Böhner, E. (1911): Ber. d. deut. chem. Ges., **44**, 1332.  
 Fischer, E. u. Königs, E. (1904): Ber. d. deut. chem. Ges., **37**, 4585.  
 Fischer, E. u. Königs, E. (1907): Ber. d. deut. chem. Ges., **40**, 2048.  
 Fischer, E., Kropp, W. u. Stahl Schmidt, A. (1909): Liebigs Annalen  
 der Chemie, **365**, 181.  
 Matsui, J. (1933): J. of Biochem., **17**, 163.  
 Rice, F. E. (1915): J. Americ. Soc., **37**, 139.  
 Suzuki, K. (1931): J. of Biochem., **13**, 57.  
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Linderström-Lang, K. (1927): Zs. f.  
 physiol. Chem., **166**, 241.  
 Waldschmidt-Leitz, E. u. Künstner, G. (1927): Zs. f. physiol.  
 Chem., **171**, 299.



## A NOTE ON MEASURING METHODS OF METHYLGLYOXAL.

By

TAKEHIKO TAKAHASHI.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College, Niigata.  
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, January 23, 1933)

Until recent years the study of methylglyoxal was hampered by lack of a suitable analytical method. The increasing knowledge of methylglyoxal has, however, assisted the device of a method for measuring it so much that more than ten methods have been reported during the last few years. These are, including the early method of Pincus (1898), the methods of Kuhn and Heckscher (1926), Toenniessen and Fischer (1926), Friedemann (1927), Fischler and Boettner (1928), Neuberg and Kobel (1928), Baer (1928), Ariyama (1928), Neuberg and Scheuer (1929), Spoehr and Strain (1930), Barrenscheen and Dreguss (1932), Stöhr (1932), etc. The object of this short note is to submit a close scrutiny of the methods.

So far as examined, the methods of Friedemann, Fischler-Boettner, Neuberg-Kobel, and Barrenscheen-Dreguss were found, in addition to that of Ariyama, to be the most reliable.

### THE FRIEDEMANN METHOD.

The principle of this method consists in measuring the amount of acetic and formic acid produced from methylglyoxal by the action of hydrogen peroxide in a strong alkaline medium. In the original method neutral  $\text{H}_2\text{O}_2$  and excess of  $N/10$   $\text{NaOH}$  are added to a neutral solution of methylglyoxal, and the mixture is titrated with  $N/10$   $\text{HCl}$  after standing 10 minutes at room temperature. This method gives a consistent result. But the

present writer recommends that the mixture be left alone for 30 minutes instead of 10 minutes before the titration even when excess of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NaOH}$  are used. This caution is especially needed when a large amount of methylglyoxal is to be determined. 5 cc. of 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 16 cc. of  $N/10$   $\text{NaOH}$  suffice for the determination of 25 mg. of methylglyoxal. The change in the quantity of methylglyoxal accompanies a concomitant increase or decrease in the amounts of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NaOH}$ . An accurate result cannot be expected when the quantity of methylglyoxal is less than 5 mg., since titration of a very small amount of acid produced introduces a great error in the experiment. The determination of methylglyoxal of more than 120 or 130 mg. will be troubled by a great increase of the quantities of the reagents.

#### THE FISCHLER-BOETTNER METHOD.

This is an iodometric method. A solution of methylglyoxal is added with a measured excess of  $N/10$  iodine solution and the mixture is then made alkaline with  $N$   $\text{NaOH}$ . After 30 minutes' standing with occasional stirring it is acidified with  $N$   $\text{HCl}$  and the liberated iodine, which has not been consumed by methylglyoxal for the production of iodoform, is titrated with  $N/10$  thiosulphate. 1.0 cc. of the thiosulphate solution corresponds to 0.9 mg. of methylglyoxal. The present writer found that 10 cc. of  $N/10$  iodine solution and 3 cc. of  $N$   $\text{NaOH}$  solution were required for the determination of 5 mg. of methylglyoxal. When a larger or smaller amount of methylglyoxal than this value is to be estimated the amount of iodine and  $\text{NaOH}$  should be proportionally increased or reduced. The minimum amount of methylglyoxal which can be determined accurately is 1.5 mg. The determination of an amount of methylglyoxal greater than 25 mg. carries with it the technical inconvenience of handling a large volume of solution. It is to be noted that consistent results cannot be obtained unless  $\text{NaOH}$ -solution is run into the mixture of methylglyoxal and iodine all together at one time. The slower addition of  $\text{NaOH}$ -solution results in the lower consumption of iodine. Another fact to be mentioned is that the value of methylglyoxal obtained by the

Fischler-Boettner method is somewhat lower than that by the Friedemann method; the former covers 94% of the latter. To know which of these methods gives the more accurate result, the methods were subjected to the following test. Known amounts of methylglyoxal were simultaneously determined by the Friedemann, Fischler-Boettner and Neuberg-Kobel methods, and the results thus obtained were compared one with another. As is shown in Table I the Neuberg and Kobel method gave results which were closer to Fischler and Boettner's method than Friedemann's.

TABLE I.  
Comparison of Friedemann's, Fischler-Boettner's and  
Neuberg-Kobel's Method.

Method	Amount of methylglyoxal found (mg.)		
	I	II	III
Friedemann	35.50	17.75	7.10
Fischler-Boettner	33.37	16.68	6.68
Neuberg-Kobel	34.32	16.53	6.58

Spoehr and Strain seem to be the only investigators who ever made a comparative study of the measuring methods of methylglyoxal. They reported that Friedemann's method gave 81.7 ( $\pm 0.5$ )% and Fischler and Boettner's method gave 83.1 ( $\pm 0.2$ )% of the "theoretical amount" of methylglyoxal which was prepared by distilling glyceraldehyde with dilute sulphuric acid. The "theoretical amount" may probably mean the amount of methylglyoxal which is produced from glyceraldehyde assuming that 100% conversion takes place. If so, the assumption is not correct, since, as will be shown later, the yield of methylglyoxal from glyceraldehyde is below 93% of the theoretical value under the most suitable conditions. Spoehr and Strain emphasized that in the Fischler and Boettner method excess of alkali and iodine should be added. Nevertheless, the quantities of alkali and iodine scarcely exceeded the theoretically necessary amounts in some of the experiments of these investigators.

Though the methods of Friedemann and of Fischler and Boettner work fairly well in the pure solution of methylglyoxal, they are incapable of general application. When methylglyoxal is to be determined in a solution which contains many other substances besides it, here we are not dealing with simple oxidation of methylglyoxal but complicated oxidation of these substances; thus producing acids or consuming iodine in a far larger quantity than the real value. Even when a pure solution of methylglyoxal is simply treated by alkali and the decrease of methylglyoxal is followed by these methods, the error involved through the use of these methods is too great to be permissible: this must be due to the intervention of the reaction-products in the determining methods. It will be recalled that Bernhauer and Tschinkel (1931) distilled glucose solution which contained sulphuric acid and  $\text{FeSO}_4$ , in the presence of hydrogen peroxide and measured the content of methylglyoxal in the distillate by Fischler's method. These results cannot be interpreted as showing absolute values, because there may be produced, in addition to methylglyoxal, numerous substances which consume iodine. By repeating his method it was found that the value of methylglyoxal determined by the Fischler method was about 10 times higher than the true one, and that the Friedemann method gave still higher value. Girsavicius (1931) reported that he modified Friedemann's method so as to fit it for the determination of methylglyoxal in the solution which contained tissue extract as the source of glyoxalase. However, the reliability of this modification is doubtful for the reason referred to above.

#### THE COLORIMETRIC METHOD OF BARRENSCHEEN AND DREGUSS.

The principle of this method is to produce a violet color by adding an alcoholic solution of potassium hydroxide to methylglyoxal which has been isolated in a pure state as 2,4-dinitrophenylbishydrazone. The use of a technique based on the method of Neuberg and Kobel in this method offers a way out of the general weak point of the colorimetric method that other sub-

stances than the substance under examination may also participate in the color production. Another strong point of this method is the extreme sensitivity of the color reaction. However, the method in which a minute quantity of bishydrazone is to be repeatedly (8 times at least) washed, requires some practice and much time. It was found that the quantity of alcoholic KOH-solution which was to be added to bishydrazone for the maximum color production, could be much more reduced than that described in the original paper. 30 cc. of 50% alcoholic solution which contains KOH in an amount of 4% are enough for 0.1 mg. of methylglyoxal, and the mixture can be diluted to a required volume with water. But the total volume should not far exceed 100 cc., since great dilution with water introduces a brown tint into the color. When great dilution is necessary the alcoholic KOH-solution should be used alone for dilution. The use of such a large amount of concentrated alcohol as described in the original paper is always accompanied by the difficulty that the color solution becomes turbid. This is easily avoided by using dilute alcoholic solution, without reducing the depth of color. The quantitative proportion between methylglyoxal and alcoholic KOH-solution remains the same with the varying amount of methylglyoxal. The minimum quantity of methylglyoxal which can be measured accurately is 0.025 mg; a quantity of methylglyoxal less than this value gives a low result unless a known amount of methylglyoxal is added before converting it to 2,4-dinitrophenylbishydrazone. Barrenscheen's description that 1 $\gamma$  of methylglyoxal can be determined within 1% experimental error, might probably be based on the experiments in which the substance was not measured singly but after the addition of a known quantity of it.

We have used Ariyama's colorimetric method for the determination of methylglyoxal in our laboratory. We have not, however, relied exclusively upon this color reaction and we have invariably found that the indications afforded by other methods have run closely parallel with those obtained by this reaction. As the parallel use of other methods was confined only to the cases of determining relatively large quantities of methylglyoxal, there

was yet left a feeling of uncertainty when small quantities of methylglyoxal were dealt with until the micro-method of Barrenschéen and Dreguss was reported. Since then we re-examined the results obtained by Ariyama's method with the use of Barrenschéen's method and found that these methods gave almost coincident results in every case.

The standard solution of methylglyoxal which is necessary for the colorimetric methods, may be prepared either by Friedemann's or Fischler and Dreguss' method.

#### PREPARATION OF METHYLGLYOXAL.

By the way, a remark will be made on the preparation of methylglyoxal. We adopted at first the Fischer and Taube (1924) or the Fischer and Feldmann method (1929) of vacuum-distillation of dihydroxyacetone with  $P_2O_5$ . But this method was soon abandoned because of the low yield of methylglyoxal and the difficulty of getting pure samples of dihydroxyacetone. Since then we have prepared methylglyoxal by distilling glyceraldehyde with dilute sulphuric acid according to Sjollem and Kam (1916) or Neuberg and his coworkers (1917). Though a concentrated solution of methylglyoxal cannot be obtained by this method, the yield is high; the yield is 93% of the theoretical value under the best conditions (2.5 gm. of glyceraldehyde + 50 cc. of 1:5 or 1:7 sulphuric acid). When a pure sample of glyceraldehyde is used, the acidity of the methylglyoxal solution is quite low; 1 cc. of 4% solution requires 0.5 cc. of  $N/100$  NaOH. The addition of aluminium sulphate to triose which was recommended by Sjollem and Kam, and Bernhauer and Görlich (1929) for the purpose of preventing the charring of sugar and thus increasing the yield of methylglyoxal, has been proved to be of no significance. Methylglyoxal samples prepared from glycerose by the simple method of Neuberg and Hofmann (1930) are highly acid and cannot be used in certain experiments. The Hofmann and Neuberg method (1930) of converting isonitrosoacetone into methylglyoxal by the action of nitrosylsulphuric acid requires time and the sample has much more acid than is contained in that

prepared from glyceraldehyde.

This work was carried out with the aid of a grant from the Department of Education.

#### SUMMARY.

Among the determination methods of methylglyoxal those of Fischler and Boettner, Friedemann, and Neuberg and Kobel are the most reliable. The colorimetric methods of Ariyama and of Barrenscheen and Dreguss also give accurate results. The best conditions for these methods were examined.

#### REFERENCES.

- Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 359.  
 Baer, E. (1928): *Arbeitsphysiol.*, **1**, 130.  
 Barrenscheen, H. K. and Dreguss, M. (1931): *Biochem. Z.*, **233**, 305.  
 Bernhauer, K. and Görlich, B. (1929): *Biochem. Z.*, **212**, 452.  
 Bernhauer, K. and Tschinkel, H. (1931): *Biochem. Z.*, **230**, 484.  
 Fischer, H. O. L. and Feldmann, L. (1929): *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **62**, 864.  
 Fischer, H. O. L. and Taube, C. (1924): *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **57**, 1502.  
 Fischler, F. and Boettner, R. (1928): *Z. analyt. Chem.*, **74**, 28.  
 Friedemann, T. E. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 331.  
 Girsavicius, J. O. (1931): *Biochem. J.*, **25**, 1807.  
 Hofmann, E. and Neuberg, C. (1930): *Biochem. Z.*, **226**, 489.  
 Kuhn, R. and Hecksher, R. (1926): *Z. physiol. Chem.*, **160**, 116.  
 Neuberg, C., Färber, E., Levite, A. and Schwenk, E. (1917): *Biochem. Z.*, **83**, 244.  
 Neuberg, C. and Hofmann, E. (1930): *Biochem. Z.*, **224**, 491.  
 Neuberg, C. and Kobel, M. (1928): *Biochem. Z.*, **203**, 463.  
 Neuberg, C. and Scheuer, M. (1929): *Monatshefte f. Chem.*, **53-54**, 1031.  
 Pincus, G. (1898): *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **31**, 31.  
 Sjollema, B. J. and Kam, A. J. H. (1916): *Rec. trav. chim. Pays-Bas*, **36**, 180.  
 Spoehr, H. A. and Strain, H. H. (1930): *J. Biol. Chem.*, **89**, 503.  
 Stöhr, R. (1932): *Z. physiol. Chem.*, **206**, 15.  
 Toenniessen, E. and Fischer, W. (1926): *Z. physiol. Chem.*, **161**, 254.



## ON MUSCLE GLYOXALASE.

By

JÛKICHI WATANABE.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College, Niigata.  
Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, January 23, 1933)

The starting point for the present investigation was the observation of Ariyama (1928) that the conversion of methylglyoxal into lactic acid was not carried out quantitatively by muscle glyoxalase while the smooth transformation was performed by liver glyoxalase. Very recently, Haarmann (1932) also observed the incomplete dismutation of methylglyoxal into lactic acid by muscle tissue. It has been often demonstrated, in the meantime, that methylglyoxal reacted on many substances, like amino acids, proteins, nucleic acid and others, without forming lactic acid at all (Neuberg, 1927; Sakuma, 1930; Girsavicius, 1930-32, Vargha, 1932 and others). With this fact now established, it may be possible to trace the cause of the incomplete production of lactic acid from methylglyoxal by muscle glyoxalase to the direct reaction of methylglyoxal with a substance or substances present in the enzyme solution. As a matter of fact, it was found in the present experiments that creatine corresponded to this substance.

### EXPERIMENTAL.

The enzyme solution was prepared by extracting one part of hashed liver or muscle of the rabbit with 4 parts of water for 10 minutes at room temperature. The enzyme solution was dialyzed, when necessary, through collodion membrane against water of 20 times its volume for 6 hours. The solution thus dialyzed was practically free from co-enzyme. The "kochsaft" was the filtrate of the enzyme solution which had been heated in a boiling water-bath for 15-20 minutes. The "kochsaft" and the

concentrated dialysate served as the co-enzyme solution. Methylglyoxal was determined by the colorimetric method either of Ariyama (1928) or of Barrenscheen and Dreguss (1931). Lactic acid was measured by the Friedemann, Cotonio and Shaffer method (1927), after distilling off the methylglyoxal present in the solution. Creatinine and creatine were determined according to the Folin method. In all the experiments, appropriate blank tests were always carried out, and corrections of the results in the main experiments were made when needed.

Lactic acid produced by muscle glyoxalase covered usually 60–70% of the methylglyoxal consumed. Dialyzed muscle glyoxalase was practically indifferent to methylglyoxal. The re-activation of the dialyzed muscle glyoxalase by the concentrated dialysate or by the “kochsaft” of muscle glyoxalase resulted in the same incomplete formation of lactic acid from methylglyoxal as before the dialysis. However, the addition of the “kochsaft” of liver glyoxalase gave the dialyzed muscle glyoxalase the ability of 100% conversion (Table I). The circumstances were just the same in the case of dialyzed liver glyoxalase. The enzyme which was re-activated by the “kochsaft” of muscle glyoxalase converted only 60–70% of methylglyoxal which disappeared, into lactic acid, while 100% transformation was observed by the addition of the

TABLE I.  
Reactivation of Dialyzed Muscle Glyoxalase by “Kochsaft”  
of Muscle and Liver.

In 100 cc.: 3 cc. of 0.1 M methylglyoxal, 10 cc. of dialyzed enzyme solution,  
5 cc. of “kochsaft” and 50 cc. of pH 7.0 borax-boric acid  
buffer solution, 37°C.

	Time of incubation (hrs.)	Decrease of methylglyoxal (mg.)	Increase of lactic acid (mg.)	Conversion of methylglyoxal into lactic acid (%)
“Kochsaft” of muscle	1.5	1.54	1.39	72.2
	3	3.89	3.41	70.2
“Kochsaft” of liver	1.5	7.12	8.35	93.8
	3	12.72	14.89	93.7

TABLE II.  
Reactivation of Dialyzed Liver Glyoxalase by "Kochsaft"  
of Muscle and Liver.

In 100 cc.: 3 cc. of 0.1 *M* methylglyoxal, 2.5 cc. of dialyzed enzyme solution,  
5 cc. of "kochsaft" and 50 cc. of pH 7 buffer solution, 37°C.

	Time of incubation (min.)	Decrease of methylglyoxal (mg.)	Increase of lactic acid (mg.)	Conversion (%)
"Kochsaft" of muscle	20	1.33	1.03	62.1
	40	2.65	2.39	72.2
"Kochsaft" of liver	20	4.68	5.58	95.4
	40	10.41	12.45	95.8

"kochsaft" of liver glyoxalase (Table II). The concentrated dialysate or the "kochsaft" of muscle glyoxalase reacted directly with methylglyoxal without forming any trace of lactic acid (Table III). The "kochsaft" and the dialysate of liver glyoxalase were shown by Ariyama and Kobayashi (1932) to consume no methylglyoxal. All these facts considered, it might be predicted that the muscle extract would contain some substance or substances which destroy methylglyoxal without producing lactic acid.

TABLE III.  
Consumption of Methylglyoxal by Dialysate or "Kochsaft"  
of Muscle Glyoxalase.

In 100 cc.: 3 cc. of 0.1 *M* methylglyoxal, concentrated dialysate or "kochsaft"  
which corresponds to 15 cc. of enzyme solution, and 50 cc.  
of pH 7 buffer solution, 37°C.

	Time of incubation (hrs.)	Decrease of methylglyoxal (mg.)	Production of lactic acid (mg.)
Dialysate	1.5	1.23	0
	3	2.58	0
	5	3.85	0
"Kochsaft"	1.5	1.39	0
	3	2.84	0
	5	4.31	0

TABLE IV.  
Distribution of Nitrogen in "Kochsaft" of Muscle and Liver  
(Protein was precipitated by Folin-Wu reagent.)

	Mg. in 100 cc.			
	Total nitrogen	Protein-nitrogen	Amino-nitrogen	Residual nitrogen
"Kochsaft" of muscle	92.40	2.10	14.04	76.26
"Kochsaft" of liver	74.20	14.70	23.90	30.60

Upon examining the distribution of nitrogen in the "kochsaft" of muscle and liver by using Folin-Wu's reagent as the protein precipitant, it was found that the residual nitrogen-fraction of the "kochsaft" of muscle far exceeded that of the liver (Table IV). Since nitrogen-free constituents of muscle extract are, so far as we know, indifferent to methylglyoxal, it was now assumed that the substance under examination would be present in the residual nitrogen-fraction. That amino acids were out of the question was readily deduced from the fact that the "kochsaft" of liver was quite indifferent towards methylglyoxal in spite of its richer content of amino-nitrogen than the "kochsaft" of muscle. Among amino acids, including hexone bases, arginine was the only amino acid which consumed methylglyoxal to a measurable extent when methylglyoxal was brought into contact with them under the conditions of present experiments. The distribution of nitrogen in the "kochsaft" of muscle was greatly changed when it was treated with the West, Scharles and Peterson reagent for protein precipitation (1929). This powerful reagent reduced the value of residual nitrogen from 76.3 mg. (in the Folin-Wu filtrate) to about 18 mg. per 100 cc. of the filtrate. Nevertheless the methylglyoxal-combining power was not weakened so much by the reagent in comparison with that of the original "kochsaft" (Table V). Then the substance under examination should be a substance which is partly precipitated by the West reagent. Glutathione, nucleic acid, purine bases and carnosine were excluded, since these com-

TABLE V.

Methylglyoxal-Combining Power of West Filtrate.

In 100 cc.: 3 cc. of 0.1M methylglyoxal, 30 cc. of original "kochsaft"  
or a quantity of West filtrate which corresponds to 30 cc.  
of original "kochsaft," 50 cc. of pH 7 buffer solution. 37°C.

Time of incubation (hrs.)	Decrease of methylglyoxal (mg.)	
	Original "kochsaft"	West filtrate
0.5	1.06	1.04
1	1.70	1.77
2	3.10	2.98
3	4.54	4.17
5	6.22	5.43

TABLE VI.

Creatine and Creatinine Content in "Kochsaft" of  
Muscle and West Filtrate.

	Mg. in 100 cc.	
	Creatine	Creatinine
"Kochsaft"	91.07	12.35
West filtrate	65.36*	5.16*

\* Converted into the value in 100 cc. of the original "kochsaft".

pounds were almost completely precipitated by West's reagent. The remaining constituents of the "kochsaft" of muscle which require consideration were, so far as we know, creatine and creatinine. These substances, especially creatine, were found in a large amount in the original "kochsaft" and in the West filtrate (Table VI). Since creatine and creatinine occupied almost 85% of nitrogen in the filtrate, the other nitrogenous substances present, if any, would be beside the question. It is shown in Table VI that 28.2% of creatine and 58.2% of creatinine of the "kochsaft" were precipitated by the West reagent. Creatinine was not only present in the "kochsaft" or in the filtrate in a much smaller amount than creatine but its activity towards methylglyoxal was

found to be about one tenth of that of creatine. It may then be predicted with a fair degree of certainty that the creatine may be regarded as identical with the substance under examination. This assumption found further support in the fact that the same quantity of creatine as was present in the "Kochsaft" or in the West filtrate consumed methylglyoxal at the same rate as the "kochsaft" or the filtrate (Table VII).

TABLE VII.  
Consumption of Methylglyoxal by Creatine, "Kochsaft"  
and West Filtrate.

In 100 cc.: 3 cc. of 0.1 *M* methylglyoxal, 30 cc. of "Kochsaft" (= 27.32 mg. creatine) or 33 cc. of West Filtrate (= 19.61 mg. creatine), 27.32 mg. or 19.61 mg. of creatine, 50 cc. of pH 7 buffer solution. 37°C.

	Time of incubation (hrs.)	Decrease of methylglyoxal (mg.)	Production of lactic acid (mg.)
"Kochsaft"	1	1.80	0
	3	4.51	0
	5	6.46	0
27.32 mg. of creatine	1	1.80	0
	3	4.51	0
	5	6.38	0
West filtrate	1	1.70	0
	3	4.05	0
	5	5.91	0
19.61 mg. of creatine	1	1.69	0
	3	3.83	0
	5	5.41	0

#### CONCLUSION.

The incomplete conversion of methylglyoxal into lactic acid by muscle glyoxalase is due to the fact that creatine which is present in the enzyme solution, reacts directly with a part of

methyglyoxal and inhibits its conversion into lactic acid by glyoxalase.

## REFERENCES.

- Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 359.  
Ariyama, N. and Kabayashi, E. (1932): *J. Biochem.*, **16**, 317.  
Barrensheen, H. K. and Dreguss, M. (1931): *Biochem. Z.*, **233**, 305.  
Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.  
Girsavicius, J. O. (1930): *Biochem. J.*, **24**, 446.  
Girsavicius, J. O. (1931): *Biochem. J.*, **25**, 1807.  
Girsavicius, J. O. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 155.  
Haarmann, W. (1932): *Biochem. Z.*, **255**, 125.  
Neuberg, C. and Kobel, M. (1927): *Biochem. Z.*, **185**, 477; **188**, 197.  
Sakuma, F. (1930): *J. Biochem.*, **12**, 247.  
Vargha, L. (1932): *Biochem. Z.*, **246**, 214.  
West, E. S., Scharles, F. H. and Peterson, V. L. (1929): *J. Biol. Chem.*, **82**, 137.

